

Aus dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Vergleich von SISPA und *random*-PCR als sequenzunabhängige  
Amplifikationsmethoden zum schnellen und einfachen Nachweis  
unbekannter DNA-Viren

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tierärztlichen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Eva Dittberner  
aus Burglengenfeld  
2015

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun  
**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek  
**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

**Tag der Promotion:** 31.01.2015

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Neuauf tretende Infektionskrankheiten .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Neuauf tretende Zoonosen .....	2
1.2.	Faktoren für Krankheitsausbrüche .....	3
1.3.	Überwachung neuauftretender Infektionskrankheiten .....	4
<b>2.</b>	<b>Diagnostik unbekannter oder nicht vermuteter Viren durch virologische Methoden .....</b>	<b>5</b>
2.1.	Klassische virologische Methoden.....	6
2.2.	Serologische Methoden .....	7
<b>3.</b>	<b>Diagnostik unbekannter oder nicht vermuteter Viren durch molekulargenetische Methoden .....</b>	<b>8</b>
3.1.	Nicht-amplifizierende Methoden .....	8
3.2.	Amplifizierende Methoden .....	9
3.2.1.	Sequenzabhängige Methoden.....	9
3.2.1.1.	<i>Singleplex-PCR</i> .....	9
3.2.1.2.	<i>Multiplex-PCR</i> .....	10
3.2.1.3.	<i>Consensus-PCR</i> .....	10
3.2.2.	Sequenzunabhängige Methoden.....	11
3.2.2.1.	<i>Rolling circle amplification</i> .....	11
3.2.2.2.	<i>Representational difference analysis</i> .....	12
3.2.2.3.	<i>Sequence-independent single primer amplification</i> .....	14
3.2.2.4.	<i>Random-PCR</i> .....	21
<b>4.</b>	<b>Methoden zur Charakterisierung von PCR-Produkten.....</b>	<b>25</b>
4.1.	Hybridisierung.....	25
4.2.	<i>Screening</i> von Expressionsbibliotheken.....	25
4.3.	DNA-Microarrays.....	26
4.4.	Sequenzierung und Datenbankabgleich .....	27
4.4.1.	Sequenzierungsverfahren und deren Automatisierung .....	28
4.4.2.	<i>Next-generation-sequencing</i> .....	30
4.4.3.	Datenbankabgleich .....	32

<b>III.</b>	<b>GEWÄHLTE STRATEGIEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>34</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Herstellung des Probenmaterials und <i>real time</i>-PCR .....</b>	<b>35</b>
1.1.	Zellkulturüberstand und Zellen .....	35
1.2.	Liquor .....	36
1.3.	Gewebeproben.....	36
1.4.	EHV-1-spezifische <i>real time</i> -PCR .....	36
1.4.1.	Freisetzung und Isolierung der EHV-1-DNA .....	36
1.4.2.	Durchführung der PCR.....	37
1.4.3.	Auswertung .....	38
<b>2.</b>	<b>Vorversuche zum Enzymverdau.....</b>	<b>38</b>
2.1.	Wirksamkeit der DNase .....	39
2.1.1.	Effekt der DNase auf EHV-1-DNA .....	39
2.1.2.	Einfluss von Gewebe auf Effekt der DNase auf EHV-1-DNA.....	39
2.2.	Nachweis der schützenden Wirkung des Viruskapsids.....	40
<b>3.</b>	<b>Anreicherung viraler Nukleinsäure und Vorbehandlung des Probenmaterials nach SISPA- bzw. <i>random</i>-PCR-Protokoll.....</b>	<b>40</b>
3.1.	Filtration .....	40
3.2.	DNase-Verdau .....	41
3.3.	Restriktionsenzymverdau .....	41
3.4.	Ligation .....	42
3.4.1.	Herstellung des Adaptermoleküls .....	42
3.4.2.	Ligation des Adapters an die <i>Template</i> -DNA .....	43
<b>4.</b>	<b>Sequenzunabhängige Amplifikation.....</b>	<b>43</b>
4.1.	SISPA .....	44
4.2.	<i>Random</i> -PCR.....	45
<b>5.</b>	<b>Charakterisierung der PCR-Produkte.....</b>	<b>46</b>
5.1.	Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese.....	46
5.2.	Klonierung.....	47
5.3.	Sequenzierung .....	49
5.4.	BLAST-Suche .....	49
5.5.	Sequenzierungsergebnisse.....	49

<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>1.</b>	<b>Wirksamkeit der DNase.....</b>	<b>52</b>
1.1.	Effekt der DNase auf EHV-1-DNA aus Zellkulturüberstand .....	52
1.2.	Einfluss von Gewebe auf den Effekt der DNase auf EHV-1-DNA .....	53
<b>2.</b>	<b>Protektion viraler DNA durch Kapsid und Hülle vor enzymatischem Abbau .....</b>	<b>54</b>
<b>3.</b>	<b>Verlust viraler DNA bei Durchführung des SISPA- bzw. <i>random</i>-PCR-Protokolls.....</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse des SISPA-bzw. <i>random</i>-PCR-Protokolls.....</b>	<b>58</b>
4.1.	Ausgangsmaterial .....	58
4.2.	Darstellung der Sequenzierungsergebnisse .....	58
4.3.	Ergebnisse der SISPA .....	59
4.3.1.	Vorversuche zur Ligation.....	59
4.3.2.	Zellkulturüberstand .....	61
4.3.3.	Zellsuspension .....	63
4.3.4.	Liquor .....	64
4.3.5.	Gewebe.....	64
4.3.5.1.	Lebergewebe .....	64
4.3.5.2.	Gehirngewebe.....	65
4.4.	Ergebnisse der <i>random</i> -PCR.....	66
4.4.1.	Zellkulturüberstand .....	66
4.4.2.	Zellsuspension .....	67
4.4.3.	Liquor .....	68
4.4.4.	Gewebe.....	68
4.4.4.1.	Lebergewebe .....	68
4.4.4.2.	Gehirngewebe.....	69
4.4.5.	Kontrollen.....	70
<b>5.</b>	<b>Genomabschnitte der Klone mit Homologie zu EHV-1.....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Länge der Fragmente mit EHV-1-Sequenzhomologie.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse beider Methoden .</b>	<b>76</b>
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>1.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse aus den Vorversuchen .....</b>	<b>79</b>

1.1.	Wirksamkeit der DNase und protektive Wirkung des Viruskapsids.....	79
1.2.	Verlust viraler DNA bei Durchführung des SISPA- bzw. <i>random</i> -PCR- Protokolls .....	83
<b>2.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse der SISPA- und <i>random</i>-PCR-Methode...</b>	<b>84</b>
2.1.	SISPA .....	84
2.2.	<i>Random</i> -PCR.....	86
2.3.	Interpretation unter quantitativen Aspekten .....	86
<b>3.</b>	<b>Kontaminationsanfälligkeit .....</b>	<b>87</b>
<b>4.</b>	<b>Probenmaterialien .....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>Sequenzunabhängigkeit der Methoden.....</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>93</b>
6.1.	Bewertung der Probenmaterialien und der Tauglichkeit zum Nachweis unbekannter DNA-Viren .....	93
6.2.	Erfüllung der Kriterien an eine Diagnostikmethode und die Tauglichkeit für den Diagnostikeinsatz.....	95
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>98</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
<b>X.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>117</b>
<b>1.</b>	<b>Materiallisten.....</b>	<b>117</b>
1.1.	Kommerzielle Chemikalien, Enzyme und Lösungen.....	117
1.2.	Kommerzielle Kits .....	117
1.3.	Hergestellte Puffer und Lösungen .....	118
1.4.	Verbrauchsmaterial .....	118
1.5.	Geräte und Software .....	119
<b>2.</b>	<b>BLAST-Listen.....</b>	<b>120</b>
2.1.	SISPA .....	120
2.2.	<i>Random</i> -PCR.....	122
<b>3.</b>	<b>Sequenzen der Klone mit Sequenzhomologien zu EHV-1.....</b>	<b>122</b>
3.1.	Sequenzen der SISPA-Methode .....	122
3.2.	Sequenzen der <i>random</i> -PCR-Methode.....	125

---

<b>4.</b>	<b>Karte von Vektor pCR®4-TOPO .....</b>	<b>127</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>128</b>



**ABKÜRZUNGS- UND EINHEITENVERZEICHNIS**

AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>	LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Abb.	Abbildung	M	Molar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	-mer	Oligonukleotid mit x Basen
bp	Basenpaare	MERS-CoV	<i>Middle eastern respiratory syndrome</i> -Coronavirus
BPV-10	Bovines Papillomavirus-10	Min.	Minuten
bzw.	Beziehungsweise	mind.	Mindestens
°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
cDNA	<i>Copy</i> -DNA	µl	Mikroliter
Ct	Schwellenwertzyklus	mm	Millimeter
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-triphosphat	µm	Mikrometer
ddTTP	Didesoxythymidin-triphosphat	mRNA	<i>Messenger</i> -RNA
d. h.	Das heißt	NaCl	Natriumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DNase	Desoxyribonuklease	ng	Nanogramm
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat	NGS	<i>next-generation-sequencing</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	nm	Nanometer
Dr.	Doktor	OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit
ds	Doppelsträngig	ORF	Offenes Leseraster
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PAN	<i>Particle-associated nucleic acid</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit	PCR	Polymerasekettenreaktion
EHV-1	Equines Herpesvirus-1	pg	Pikogramm
<i>et al.</i>	Und andere	p.i.	<i>Post infectionem</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Pro-MED-mail	<i>Program for Monitoring Emerging Diseases</i>
fg	Femtogramm	RCA	<i>Rolling circle amplification</i>
ggf.	Gegebenenfalls	RDA	<i>Representational difference analysis</i>
kb	Kilobase	RNA	Ribonukleinsäure
LB	<i>Lysogeny broth</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute
log	Logarithmisch	s.	Siehe

SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome-Coronavirus</i>
SBV	Schmallenbergvirus
sec.	Sekunde
SISPA	<i>Sequence-independent single primer amplification</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
sog.	Sogenannt
ss	Einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Tris-Ethylendiamin-tetraacetat-Puffer
TGS	<i>Third generation-sequencing</i>
TM	Unregistrierte Handelsmarke
u. a.	Unter anderem
US	Vereinigte Staaten
usw.	Und so weiter
VIDISCA	<i>Virus-Discovery-cDNA-amplified fragment length polymorphism</i>
vgl.	Vergleiche
WAHIS	<i>World Animal Health Information System</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x	Mal, -fach
x g	X-fache Erdbeschleunigung
z. B.	Zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent

## I. EINLEITUNG

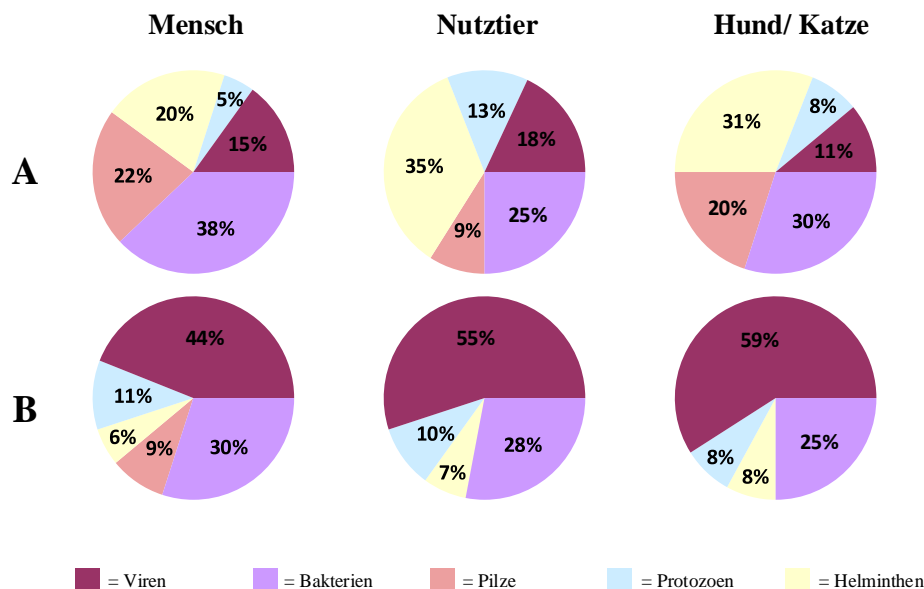
Pathogene von Mensch und Tier zeichnen sich durch eine weltweite Vielfalt aus. Viren als Auslöser zahlreicher Krankheiten und Zoonosen nehmen dabei einen wichtigen Stellenwert ein. Gerade als Erreger neuer und wieder auftretender Krankheiten spielen sie aufgrund einer Vielzahl an Eigenschaften eine bedeutende Rolle und treten immer wieder als Ursache von Krankheitsausbrüchen auf (Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005). Daneben ist ihre Bedeutung als Infektions- und Kontaminationsquelle von Spenderblut, Impfstoffen und anderen Biologika, aber auch ihre mögliche Beteiligung an ungeklärten akuten und chronischen Krankheiten nicht zu vernachlässigen (Feng *et al.*, 2008; Chiu, 2013). Seit den Anfängen der virologischen Forschung konnten dank intensiver wissenschaftlicher Bestrebungen unzählige Viren identifiziert und charakterisiert werden und somit eine Grundlage für deren Bekämpfung und Prophylaxe geschaffen werden. Angefangen bei den klassischen virologischen Methoden wurde das diagnostische Repertoire durch moderne molekulare Techniken erweitert, wodurch in manchen Fällen eine schnellere und genauere Erregeridentifizierung möglich geworden ist (Tang und Chiu, 2010). Trotz der immensen Zahl bereits aufgedeckter Viren scheint die Quelle bisher unbekannter Viren nicht erschöpflich zu sein (Morse, 1995). Gerade aber unbekannte oder unvermutete Viren stellen die Diagnostik vor eine schwierige Aufgabe. Ohne das Wissen über die Natur bzw. das Genom eines Virus kann eine Identifizierung mit den üblichen diagnostischen Routinemaßnahmen zu einer zeit- und kostenintensiven Aufgabe werden. Methoden, die einen Nachweis ohne Wissen über deren Genomsequenz zum Ziel haben, also sequenzunabhängig sind, können die Diagnose erleichtern (Ambrose und Clewley, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die SISPA und *random*-PCR, zwei sequenzunabhängige Methoden zur Aufdeckung unbekannter bzw. unvermuteter Viren, vergleichend zueinander getestet werden. Zu diesem Zweck wurden Proben mit absteigendem Virus- und ansteigendem Gehalt an Fremd-Desoxyribonukleinsäure (DNA) verwendet. Als Modell diente das Equine Herpesvirus-1 als Vertreter doppelsträngiger DNA-Viren. Ziel war es, das Virus mittels selektiver Anreicherung und sequenzunabhängiger Amplifikation durch Klonierung, Sequenzierung und Datenbankabgleich wiederzufinden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Neuauftretende Infektionskrankheiten

Unter einer neuauftretenden Krankheit (engl. *emerging disease*) versteht man das erstmalige Vorkommen einer Krankheit, Infektion oder Infestation mit bedeutendem Einfluss auf die Gesundheit von Mensch und Tier, die aus der Veränderung eines bekannten Pathogens oder dessen Ausbreitung in einem neuen geografischen Gebiet oder in einer neuen Spezies hervorgeht oder aus der Erstdiagnose eines bisher unbekannten Pathogens oder einer Krankheit resultiert (OIE, 2014). Unter der Vielfalt an Pathogenen nehmen Viren als Erreger neuauftretender Krankheiten eine wichtige Stellung ein (Abbildung 1) (Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005; Jones *et al.*, 2008; Anthony *et al.*, 2013). Vor allem Ribonukleinsäure-Viren (RNA-Viren) fungieren aufgrund ihrer hohen Mutationsrate als Erreger neuauftretender Krankheiten (Hatta *et al.*, 2001; Tsetsarkin *et al.*, 2007; Sheahan *et al.*, 2008; Stucker *et al.*, 2012; Combe und Sanjuan, 2014).



**Abb. 1: Taxonomische Klassifikation aller Pathogene (A) und aller neuauftretenden Pathogene (B) von Mensch (links), Nutztier (Mitte) und Hund/Katze (rechts); modifiziert nach Cleaveland *et al.*, 2001**

#### 1.1. Neuauftretende Zoonosen

Unter den neuauftretenden Krankheiten befinden sich zahlreiche Zoonosen, von denen angegeben wird, dass sie einen Anteil von bis zu 75 Prozent ausmachen

(Taylor *et al.*, 2001). Zoonosen sind definitionsgemäß Krankheiten oder Infektionen, die natürlicherweise von Tier auf Mensch übertragen werden (OIE, 2014). Der Großteil dieser Zoonosen entspringt der Wildtierpopulation (Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005; Jones *et al.*, 2008; Kurth *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014). So haben sich zum Beispiel Fledermäuse und Flughunde im Laufe der letzten Jahre als Reservoir vielfältiger humanpathogener Viren wie etwa Hendra- Nipah-, Ebola- und Marburgviren herausgestellt (Calisher *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011; Drexler *et al.*, 2012; Olival *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014).

Der zoonotische Pool (Morse, 1995) ist eine wichtige und reichhaltige Quelle für neuauftretende Krankheiten. Beispielsweise waren *severe acute respiratory syndrome*-Coronavirus (SARS-CoV), Hantaviren, Ebola- und Marburgviren, Nipah- und Hendravirus sowie das Humane Immundefizienzvirus -1 und -2 vor ihrem Wirtswechsel auf den Menschen zwar bestehende enzootische Viren, sie waren jedoch nicht bekannt. Die regelmäßige Identifizierung solch „neuer“ Zoonosen lässt darauf schließen, dass der Pool längst nicht erschöpft ist (Morse, 1995; Parrish *et al.*, 2008).

Fünftausend Säuger- und 10000 Vogelarten sind beschrieben. Wenn man davon ausgeht, dass jede davon einige spezifische endemische Viren beherbergt, ist die Gesamtzahl neuer unentdeckter Pathogene sicher sehr viel größer als die bisher bekannte Zahl an charakterisierten Erregern, die sich auf lediglich 2000 – 3000 beläuft (Woolhouse *et al.*, 2008; Morse *et al.*, 2012).

## 1.2. Faktoren für Krankheitsausbrüche

In der Literatur werden zahlreiche Faktoren genannt, die mit dem Neu- und Wiederauftreten von Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Zum einen sind Eigenschaften des Pathogens wie Resistenzentwicklung (Bloom *et al.*, 2010) und Pathogenitätssteigerung durch Veränderungen im Erregergenom (Klein *et al.*, 2014) zu berücksichtigen. Weiterhin kann die Empfänglichkeit des Wirts, etwa durch Immunsuppression (van der Meijden *et al.*, 2014; van Riel *et al.*, 2014) oder Unter- bzw. Mangelernährung (Hickman *et al.*, 2014) das Auftreten einer Infektionskrankheit begünstigen. Populationscharakteristika haben eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung. Die weltweite Stadtbevölkerung soll bis zum Jahr 2050 auf 67 Prozent angestiegen sein (United Nations, 2012). Durch Landflucht wird es Infektionen, die in abgelegenen ländlichen Gegenden entstanden sind und

lokal begrenzt geblieben wären, ermöglicht, in Großstädte einzufallen und deren Bewohner zu infizieren (Morse, 1995; Bhatt *et al.*, 2013; Gatherer, 2014). Internationaler Handel und Reiseverkehr erleichtern und beschleunigen den Weitertransport der Erreger durch Verkehrs- und Luftwege (Morse, 1995; Hosseini *et al.*, 2010; Huang und Tatem, 2013; Nunes *et al.*, 2014). Tatsächlich ist es infizierten Individuen oder Vektoren durch modernen Flugverkehr mittlerweile möglich in weniger als 24 Stunden um die Welt zu reisen (Lipkin, 2013). Illegaler Handel (Costard *et al.*, 2013), moderne Lebensweisen wie die Haltung exotischer Haustiere (Durand *et al.*, 2013) und ausgefallene Essgewohnheiten (Wolfe *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2012) tragen zusätzlich zur Einschleppung von Pathogenen und deren Etablierung in der menschlichen Gesellschaft bei.

Ökologische Veränderungen stehen besonders oft im Zusammenhang mit Ausbrüchen bisher unbekannter Zoonosen mit hoher Mortalität (Morse, 1995). Dabei spielt die Kontakthäufigkeit zwischen einem Reservoir-Wirt und einer neuen Wirtsspezies eine Schlüsselrolle (Firth und Lipkin, 2013). Vom Menschen herbeigeführte Veränderungen wie Klimawechsel (Anyamba *et al.*, 2009; Paz *et al.*, 2013), Urbanisierung mit dichtbesiedelten Elendsvierteln (Bhatt *et al.*, 2013), Abholzung von Wäldern, Lebensraumzerschneidung und Expansion der Landwirtschaft (Allan *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2008) führen zu einer Erhöhung dieser Kontaktrate (Firth und Lipkin, 2013).

Globalisierung, Industrialisierung und moderne Landwirtschaft haben Mensch und Tier für neu- und wiederauftretende Infektionskrankheiten anfällig gemacht, indem sie Ausmaß und Geschwindigkeit von Krankheitsausbrüchen verändert haben (Firth und Lipkin, 2013). Zusammenfassend entsteht der Eindruck, dass Pathogene fast alle Veränderungen in der Ökologie des Menschen, die ihnen neue Übertragungsmöglichkeiten verschaffen, ausnutzen (Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005).

### **1.3. Überwachung neuauftretender Infektionskrankheiten**

Internationale Organisationen haben es sich zur Aufgabe gemacht, neuauftretende Infektionskrankheiten weltweit zu überwachen. Die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) bietet ihren Mitgliedsstaaten mit dem *World Animal Health Information System* (WAHIS) (Kuiken *et al.*, 2005) ein Frühwarn- und Überwachungssystem, das durch eine zusätzliche Benachrichtigungspflicht für gelistete Wildtierkrankheiten erweitert worden ist. Ebenso besteht durch WAHIS-

*Wild* eine freiwillige Mitteilungsmöglichkeit für nichtgelistete Krankheiten von Wildtieren (OIE, 2013). Basiskriterien für gelistete Pathogene umfassen unter anderem internationale Ausbreitung, zoonotisches Potential mit schwerwiegenden Folgen, signifikante Morbidität und Mortalität bei Haus- oder Wildtieren und zuverlässige Diagnostikmöglichkeiten (OIE, 2014). Weitere internationale Einrichtungen im Zusammenhang mit der Überwachung von Tierpathogenen sind die *Food and Agriculture Organization* der Vereinten Nationen (FAO) und die Weltgesundheitsorganisation (WHO). Die drei genannten Einrichtungen haben sich die Umsetzung des sogenannten *One Health*-Konzepts zum Ziel gesetzt (FAO, WHO, OIE, 2010). Dieses basiert auf dem Grundgedanken, dass die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt untrennbar miteinander verbunden ist, und sieht damit eine interdisziplinäre Herangehensweise zur Krankheitsprävention vor (American Veterinary Medical Association, 2008).

In den letzten Jahren wurden Systeme entwickelt, die Informationen von Mensch und Tier für die Überwachung von Zoonosen integrieren (Lipkin, 2013; Wendt *et al.*, 2014). Sie bedienen sich vielfältiger Quellen um zoonotische Geschehen früh in deren Entwicklung aufzudecken. Beispielhaft seien in diesem Zusammenhang *Program for Monitoring Emerging Diseases (ProMED-mail)* (Madoff, 2004), *Global Public Health Intelligence Network (GPHIN)* (Mykhalovskiy und Weir, 2006), *HealthMap* (Freifeld *et al.*, 2008) oder *MedISys* (Mantero *et al.*, 2011) genannt.

Als Antwort auf die Anforderungen einer wachsenden und globalisierten Welt entwickeln sich Technologien aller Art rapide. Überwachung und Meldedienste werden immer flexibler und sind für Epidemiologen, Kliniker und Biologen weltweit verfügbar, da der Bedarf an Identifizierungs-, Charakterisierungs- und Überwachungsmethoden stetig ansteigt (Firth und Lipkin, 2013).

## **2. Diagnostik unbekannter oder nicht vermuteter Viren durch virologische Methoden**

Die Diagnostik unbekannter oder unvermuteter Viren spielt nicht nur bei Ausbruchssituationen eine große Rolle, sondern ist für die Überprüfung von Spenderblut, Impfstoffen und anderen Biologika, aber auch für die klinische

Diagnose unbekannter akuter und chronischer Infektionskrankheiten von immenser Bedeutung (Feng *et al.*, 2008; Chiu, 2013).

Klassische virologische Methoden werden nach wie vor in der Diagnostik angewendet, doch unterliegt deren systematischer Einsatz gewissen Einschränkungen. So sind sie oftmals arbeits- und zeitintensiv und weisen im Vergleich zu modernen molekularen Techniken geringere analytische Sensitivitäten auf (Tang und Chiu, 2010).

### **2.1. Klassische virologische Methoden**

Viren benötigen den zellulären Replikationsapparat für ihre Vermehrung, ihre Anzüchtung erfolgt daher im lebenden System. In der Vergangenheit geschah dies im Tier oder Brutei, heutzutage wird zu diesem Zweck fast ausschließlich die Zellkultur genutzt (Storch, 2007).

Zusammen mit der Elektronenmikroskopie stellt diese Methode eine ungerichtete und unvoreingenommene Herangehensweise zur Virusdiagnostik dar, wodurch eine Aufdeckung unvermuteter oder gänzlich unbekannter Viren potentiell erreicht werden kann. Zwar ermöglicht die Anzüchtung in Zellkultur generell die Produktion und Vermehrung von lebensfähigem Virus. Der große Nachteil an der Zellkultur hinsichtlich der Diagnostik unbekannter oder unvermuteter Viren ist jedoch, dass die sichere Auswahl einer permissiven Zellart nur mit dem Wissen über das Virus geschehen kann, welches es in diesem Fall aber gerade zu ermitteln gilt (Goldsmith *et al.*, 2013). Ferner erfordert die Kultivierung mancher Viren besondere Behandlungsschritte. So ist beispielsweise bei Circoviren eine häufige Passage der Zellen nötig, um dem Virus mitotisch aktive Zellen als Substrat bereit zu stellen. Bei vielen nicht-zythopathogenen Viren ist zudem eine weitere Detektionsmethode nötig, um die Virusvermehrung nachzuweisen (Fan *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013) getestet werden. Darüber hinaus existiert eine Reihe von Viren, die sich nur sehr mühsam kultivieren lassen oder sich der Anzüchtung gänzlich entziehen, wie unter anderem etwa Coronaviren (Chan *et al.*, 2013), Hepatitisviren (Lohmann und Bartenschlager, 2014; Nan *et al.*, 2014), Papillomaviren (Li *et al.*, 2009b), Parvovirus B19 (Heegaard und Brown, 2002), humane Noroviren (Rocha-Pereira *et al.*, 2014) oder das humane Rhinovirus C (Hao *et al.*, 2012).

Die direkte Darstellung von Viruspartikeln mithilfe der Elektronenmikroskopie ist neben der Möglichkeit der Detektierung verschiedener Viren auch nach Verlust



ihrer Vermehrungsfähigkeit in kurzer Zeit (5-10 Minuten) (Gelderblom und Hazelton, 2000; Hazelton und Gelderblom, 2003) möglich. Die Hauptlimitationen dieser Technik des „offenen Blicks“ (Gentile und Gelderblom, 2005) stellen einerseits die geringe Sensitivität (mindestens  $10^5$ - $10^6$  Partikel/ ml), als auch die Beschränkung der Technik auf bestimmte Indikationen bzw. Erregertypen und Probenmaterial wie z. B. Kotproben zur Durchfalldiagnostik oder herpes- und pockenbedingte Hauteffloreszenzen und Bläschenflüssigkeit dar. Zudem bezieht sich die Diagnose im positiven Fall lediglich auf die Virusfamilie und nie auf die Virusart (Hazelton und Gelderblom, 2003; Goldsmith und Miller, 2009).

Bis zu den 1990er Jahren war man jedoch weitgehend auf die genannten Methoden angewiesen. So wurden beispielsweise mithilfe der Zellkultur und Elektronenmikroskopie im Jahre 1976 das jetzt als Zaire-Ebolavirus bekannte und 1989 das Reston-Ebolavirus entdeckt (Johnson *et al.*, 1977; Jahrling *et al.*, 1990). Auch in der neueren Zeit haben die beiden Methoden immer wieder erste Hinweise bei der Charakterisierung von Erregern wie dem Nipah-Virus (Chua *et al.*, 2000) oder dem SARS-Coronavirus (Ksiazek *et al.*, 2003) gegeben und als Richtungsweiser für weitere diagnostische Schritte gedient.

## 2.2. Serologische Methoden

Unter serologischen Methoden versteht man den Nachweis einer spezifischen Immunreaktion durch Antigene und Antikörper. Mithilfe bekannter Antikörper können virusspezifische Antigene nachgewiesen werden. Umgekehrt wird für den Nachweis von Antikörpern ein bekanntes Virus oder Virusantigen benötigt. Relevante Tests sind etwa der Immunfluoreszenztest, die Durchflusszytometrie, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, Hämagglutinationshemmung, Immunpräzipitation, Komplementbindungsreaktion oder der Neutralisationstest, z. B. in Form eines Plaquereduktionstests. Die Virusdiagnostik durch Antigen-nachweis kann jedoch nur erfolgreich sein, wenn die antigenetische Variabilität des Zielvirus dessen Erkennung durch immunologische Reagenzien noch erlaubt (Storch, 2007). Vergleichbar verhält es sich mit dem Antikörpernachweis. Eine Anwendung wäre nur über Ausnutzung der Kreuzreaktivität zwischen verwandten Viren einer Gruppe denkbar, die jedoch nicht regelmäßig auftritt. Sie fehlt beispielsweise zwischen den beiden humanen Coronaviren SARS- und *middle eastern respiratory syndrome*-Coronavirus (MERS-CoV) (Agnihothram *et al.*, 2014). Aufgrund der erforderlichen Spezifität ist eine Verwendung von

serologischen Techniken für die Diagnostik unbekannter oder unvermuteter Viren zusammenfassend nicht praktikabel.

### **3. Diagnostik unbekannter oder nicht vermuteter Viren durch molekulargenetische Methoden**

Es gibt viele klinische Syndrome, bei denen eine Virusbeteiligung vermutet wird. Jedoch scheitern traditionelle mikrobiologische Methoden oft an deren Aufdeckung, da sie nur einen eingeschränkten Nutzen haben, wenn die Natur eines potentiellen Erregers nicht bekannt ist. Mit der Ausnahme von Prionen weisen alle Infektionserreger RNA- oder DNA-Moleküle auf, was sie für nukleinsäurebasierte diagnostische Tests zugänglich macht (Safar *et al.*, 2005; Tang und Chiu, 2010; Chiu, 2013). Seit Anfang der 1980er Jahre werden Viren unbekannter Herkunft zunehmend mithilfe molekularbiologischer Methoden aus Probenmaterial gewonnen und nachfolgend weitercharakterisiert (Ambrose und Clewley, 2006).

Diese Herangehensweise stellt einen Grundsatz der Metagenomik dar, die sich mit der Erforschung des Genoms ganzer Lebensgemeinschaften von Mikroben beschäftigt. Durch metagenomische Analysen versucht man die Identität eines Organismus ohne Kultivierung und Wissen über dessen Gensequenz zu bestimmen (Capobianchi *et al.*, 2013; Sharon und Banfield, 2013; Hunter *et al.*, 2014).

Molekulargenetische Methoden lassen sich beispielsweise unter dem Aspekt der stattfindenden Amplifikation von Nukleinsäure in nicht-amplifizierende und amplifizierende Methoden einteilen.

#### **3.1. Nicht-amplifizierende Methoden**

Vor der Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden verschiedene arbeitsintensive Methoden zur Virusaufdeckung und -amplifikation herangezogen (Ambrose und Clewley, 2006). Beispielsweise konnten Cotmore und Tattersall Anfang der 1980er Jahre das Genom eines bis dahin nicht näher charakterisierten Virus aus dem Plasma eines asymptomatischen Blutspenders klonieren, damit Hybridisierungsexperimente durchführen und als Parvovirus B19 beschreiben (Cotmore und Tattersall, 1984). Auf der Suche nach dem ätiologischen Agens einer als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichneten Erkrankung untersuchten Choo *et*

*al.* (1989) eine *copy*-DNA-Bibliothek (cDNA) aus infiziertem Organmaterial mit der Hilfe eines Bakteriophagen-Expressionssystems und antikörperhaltigen Patientenseren. Unter etwa einer Million cDNAs, die so untersucht wurden, war genau ein einziger Klon, der die genetische Information des gesuchten Erregers, des Hepatitis-C-Virus, beinhaltete (Choo *et al.*, 1989).

Die Entdeckung des Hepatitis-C-Virus gilt als Auslöser für nachfolgende Bemühungen unbekannte Viren durch molekulare Methoden aufzudecken (Allander *et al.*, 2001).

### **3.2. Amplifizierende Methoden**

Die Amplifikation von Nukleinsäuren bietet zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Diagnostikmethoden. Sie kommt zum Beispiel zum Zuge, wenn eine Viruskultivierung nicht bzw. nur schwer möglich ist oder eine limitierte Probenmenge oder geringe Erregerkonzentration eine hochsensitive Methode nötig macht. Außerdem gelingt der Genomnachweis aufgrund der Stabilität der Nukleinsäuren oftmals noch, wenn die Infektiosität des Erregers bereits verloren gegangen ist (Storch, 2007).

#### **3.2.1. Sequenzabhängige Methoden**

##### **3.2.1.1. Singleplex-PCR**

Die PCR ist eine *in vitro*-Amplifikation, bei der eine zyklisch wiederholte Verdoppelung einer spezifischen Ziel-DNA mit der Hilfe von Primern, Nukleotiden und einer hitzestabilen DNA-Polymerase stattfindet. Durch die Sequenz der Primer (= Oligonukleotide von etwa 20-30 Basenpaaren, bp) wird die Spezifität der PCR-Reaktion bestimmt. Die PCR ist nur mit DNA durchführbar, so dass nachzuweisende RNA zuvor mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben werden muss. Wird in einem Reaktionsansatz nur ein Amplifikat erzeugt, wird dies als *singleplex*-PCR bezeichnet. Der Nachweis der amplifizierten DNA kann konventionell durch Gelelektrophorese erfolgen oder mit der Hilfe von fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffen (z. B. SYBR Green) oder Sonden als *real-time*-PCR durchgeführt werden (Mullis, 1990a; Heid *et al.*, 1996; Mackay *et al.*, 2002). Durch ihre Spezifität ist die *singleplex*-PCR für die Diagnostik unbekannter oder nicht vermuteter Pathogene nicht geeignet, da pro Ansatz lediglich eine Aussage über die An- oder Abwesenheit eines einzigen, ausgewählten Pathogens getroffen werden kann (Bexfield und Kellam, 2011).

### 3.2.1.2. *Multiplex-PCR*

Hierbei wird eine Kombination mehrerer Primer verwendet, um verschiedene Pathogene gleichzeitig, d. h. in einem PCR-Ansatz, aufzudecken. Diese Herangehensweise kann sich bei der Identifizierung von Pathogenen im Rahmen von klinischen Syndromen, die nicht pathognomonisch für einen bestimmten Erreger sind, als sehr nützlich erweisen (Sanghavi *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Neue oder unvermutete Pathogene lassen sich aufgrund dieses spezifischen Charakters der konventionellen *multiplex-PCR* aber nicht identifizieren. Daneben wurde die *MassTag-PCR* entwickelt, mit der eine Aufdeckung neuer Pathogene potentiell möglich sein soll. Unter Zuhilfenahme einer Kombination mehrerer Primer, die an hochkonservierte genomische Regionen binden, also ein breiteres Spektrum von Mitgliedern einer bestimmten Pathogenspezies detektieren können und an molekulare *Tags* unterschiedlichen Gewichts gekoppelt sind, die wiederum durch UV-Licht freigesetzt werden können, werden Mikroben anhand dieser abgespaltenen *Tags* mithilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Briese *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2008).

### 3.2.1.3. *Consensus-PCR*

Durch den weitverbreiteten Einsatz der PCR und der Zugänglichkeit von Virusgenomsequenzen durch Schaffung großer Datenbanken ist es oft möglich PCR-Primer zu konstruieren, die an konservierte Regionen in Virusgenomen binden, die also von Virengruppen geteilt werden. Weil diese Regionen meist nicht vollkommen erhalten sind, d. h. sich an bestimmten Stellen untereinander in ihrer Nukleotidabfolge unterscheiden können, müssen Primer einen gewissen Grad an Degeneration aufweisen, um an alle oder zumindest die bekannten Varianten der konservierten Regionen binden zu können. Degeneriert bedeutet, dass bestimmte Nukleotide im Primer nicht genau definiert sind, sondern unterschiedliche Basen aufweisen können. Beispielsweise steht **GRA** sowohl für **GAA** als auch für **GGA**. (Kellam, 1998; Bexfield und Kellam, 2011; Chiu, 2013). Beispiele für den Einsatz degenerierter Primer in der Diagnostik sind u. a. die Aufdeckung des *Sin-Nombre-Virus* mithilfe von *consensus*-Primern gegen das M-Segment von Hantaviren (Nichol *et al.*, 1993), die Anwendung für die Diagnostik von Parainfluenzavirus-1 bis 3 mit Primern gegen die Hämagglutinin-Neuraminidase-kodierende Region (Corne *et al.*, 1999), die Entdeckung eines neuen humanen Polyomavirus bei Schimpansen durch degenerierte Primer

gerichtet gegen das Strukturprotein-1 bekannter Polyomaviren (Scuda *et al.*, 2011) oder die Identifizierung eines neuen Alphaherpesvirus, des Leporiden Herpesvirus-4, im Zusammenhang mit Todesfällen bei Hauskaninchen mit Primern gegen die Ribonukleotidreduktase-1 des Humanen Herpesvirus-1 (Jin *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu spezifischen PCR-Ansätzen besteht bei der *consensus*-PCR eine geringere Gefahr durch Sequenzabweichungen gestört zu werden, was sie z. B. für die Diagnostik hochmutagener RNA-Viren geeignet macht (Lipkin, 2010; Song *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Jedoch können hochdivergente oder komplett neuartige Viren aufgrund des Fehlens von Sequenzinformationen für das Primerdesign nicht erkannt werden (Rai *et al.*, 2011; Firth und Lipkin, 2013). Somit sind degenerierte Primer generell nur nützlich, wenn nach einer bestimmten Virusfamilie oder einem Virusgenus gesucht wird (Ambrose und Clewley, 2006).

### 3.2.2. Sequenzunabhängige Methoden

#### 3.2.2.1. Rolling circle amplification

Die *rolling circle amplification* (RCA) ist eine Technik, die sich am Replikationsmechanismus bestimmter viraler zirkulärer DNA-Moleküle orientiert. Die Methode ist für den Nachweis von Viren geeignet, die generell ein zirkuläres Genom aufweisen oder zweitweise in ihrem Replikationszyklus ein solches besitzen (Rector *et al.*, 2004b).

Mithilfe von *random*-Hexamer-Primern und der DNA-Polymerase des Bakteriophagen  $\phi 29$  kann unter isothermalen Bedingungen eine Amplifikation der zirkulären DNA durchgeführt werden. Nach dem *Annealing* der *random*-Primer (s. II.3.2.2.4.), die oft an verschiedenen Ansatzstellen der ringförmigen Nukleinsäure gleichzeitig binden können, und der Elongation des DNA-Moleküls trifft der Polymerasekomplex auf das 5'-Ende des neu synthetisierten Strangs, der vom Matrixstrang abgelöst wird. Freie Primer können nun an diesen DNA-Einzelstrang binden und ihn zum Doppelstrang ergänzen. Gleichzeitig erfolgt die weitere Verlängerung des Komplementärstrangs an der Matrize. Als Produkte der RCA entstehen somit hochmolekulare, lineare und doppelsträngige *tandem-repeat*-Kopien (Konkatamere) der ursprünglichen Sequenz, die anschließend für Sequenzierung, Restriktionsenzymanalysen oder für die Klonierung zur Verfügung stehen (Rector *et al.*, 2004b) (Abbildung 2).

Rector *et al.* konnten nach Optimierung des Protokolls der RCA eine neue Variante des Bovinen Papillomavirus-1 nachweisen und somit die Tauglichkeit der Methode für die Identifizierung unbekannter Papillomaviren belegen (Rector *et al.*, 2004b). Weitere unbekannte Papillomaviren aus unterschiedlichen Wirtsspezies konnten in der Folge mittels RCA entdeckt werden (Rector *et al.*, 2004a; Rector *et al.*, 2005; Nafz *et al.*, 2008; Scagliarini *et al.*, 2013). Die RCA wurde auch im Zusammenhang mit der Entdeckung einer neuen Genogruppe des Torque-Teno-Virus bei Schweinen (Niel *et al.*, 2005) sowie für die Charakterisierung von Circo- (Johne *et al.*, 2006) und Geminiviren (Haible *et al.*, 2006) genutzt. Eine Kombination aus SISPA (s. II.3.2.2.3) und RCA kam bei der Aufdeckung von Anelloviren zum Einsatz (Biagini *et al.*, 2007).

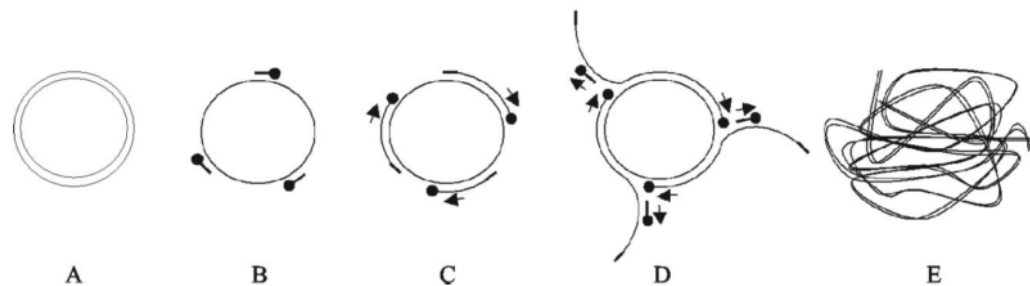


Abb. 2: Schematische Darstellung der *rolling circle amplification* (RCA)

(A) Doppelsträngige zirkuläre DNA; (B) Denaturierung zu einzelsträngiger DNA; *random*-Hexamer-Primer (-) und DNA-Polymerase (•) binden; (C) Polymerase verlängert die Primer am 3'-Ende (→). (D) Strangverdrängung bei Erreichen eines elongierten Primers; Anlagerung von Primern an verdrängtem Einzelstrang und Verlängerung durch Polymerase; (E) Weiterführung dieses Prozesses führt zu exponentieller Amplifikation der *Template*-DNA; als Ergebnis entstehen lineare, doppelsträngige Kopien des kompletten Genoms. Modifiziert nach Rector *et al.*, 2004b

### 3.2.2.2. *Representational difference analysis*

Die *representational difference analysis* (RDA) stellt eine Methode zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen zwei DNA-Populationen dar. Sie kombiniert subtraktive Hybridisierung und Genamplifikation. So kann die RDA durch den Vergleich einer prä- mit einer postinfektiösen Probe desselben Individuums zum Nachweis unbekannter Viren dienen. Das Material der präinfektiösen Probe wird als *driver* und das der postinfektiösen Probe als *tester* bezeichnet. Die isolierte DNA beider Proben wird durch Restriktionsendonukleasen in ihrer Komplexität reduziert. Zusätzlich werden an die *tester*-DNA Oligonukleotidadapter ligiert. *Driver*- und *tester*-DNA werden so miteinander inkubiert, dass sich komplementäre Stränge aneinanderlagern. Diese

können entweder homogen, d. h. entweder nur aus *tester*- oder *driver*-Fragmenten zusammengesetzt, oder heterogen sein, also aus beiden Quellen stammen. Doppelsträngige DNA-Fragmente (dsDNA), die nur im *tester* vorliegen, folglich potentiell viralen Ursprungs sind, lagern sich zu homogenen Strängen zusammen und tragen somit an beiden Enden ein Adaptermolekül. Heterogene Stränge besitzen ein einziges Adaptermolekül, homogene Stränge aus *driver*-Fragmente dagegen kein ligiertes Oligonukleotid. Im folgenden PCR-Schritt wird ein Primer verwendet, der komplementär zum ligierten Oligonukleotidadapter ist. Fragmente ohne Oligonukleotid werden nicht, Fragmente mit einem Oligonukleotidadapter nur linear amplifiziert. Nur Fragmente mit zwei Adaptern werden exponentiell vermehrt. Übrige einzelsträngige DNA wird enzymatisch gespalten. Diese subtraktive Amplifikation kann bis zum Erreichen einer ausreichenden Anreicherung der *tester*-Fragmente mehrmals wiederholt werden (Lisitsyn *et al.*, 1993) (Abbildung 3).

Ein Beispiel für die Verwendung der RDA bei der Suche nach unbekannten Viren ist die Identifizierung des Kaposi-Sarkom-Virus (Chang *et al.*, 1994), die Entdeckung des Hepatitis-G-Virus (Simons *et al.*, 1995) oder des TT-Virus (Nishizawa *et al.*, 1997), der nach den Initialen des Patienten, aus dessen Serum die Erstisolierung stattgefunden hatte, benannt wurde und mittlerweile als Torque-Teno-Virus bezeichnet wird (Niel *et al.*, 2005).

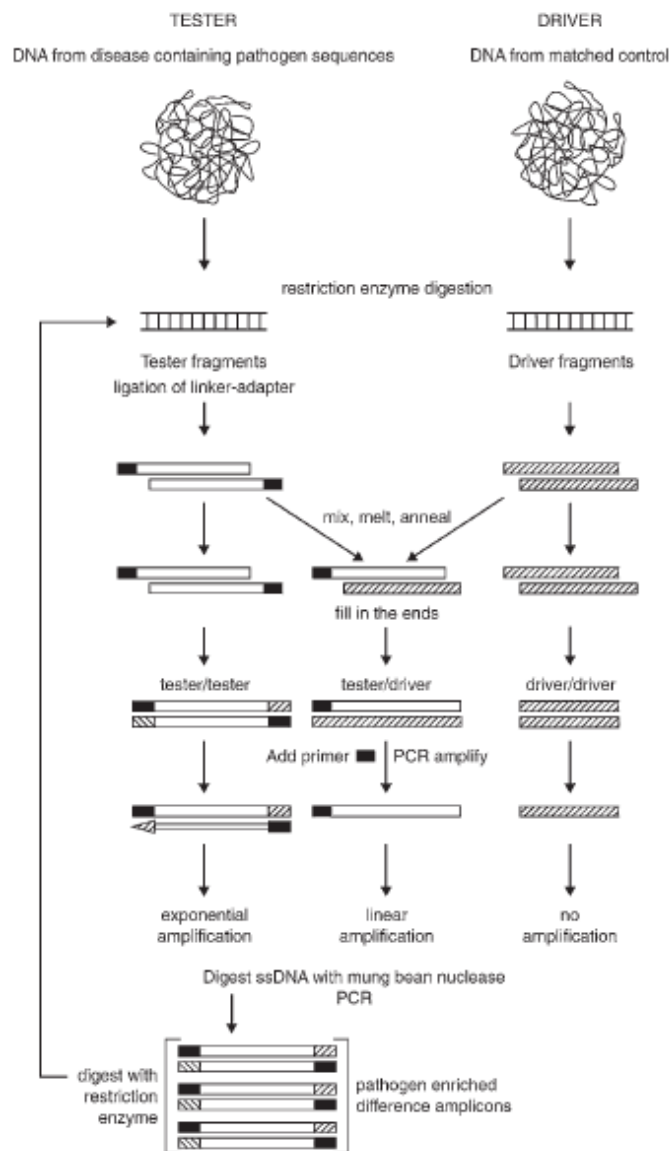


Abb. 3: Schematische Darstellung der *representational difference analysis*

ssDNA: *single-stranded DNA* (einzelsträngige DNA); Quelle: Ambrose und Clewley, 2006

### 3.2.2.3. *Sequence-independent single primer amplification*

Die Methodik der *sequence-independent single primer amplification* (SISPA) wurde unter dieser Bezeichnung erstmals durch Reyes und Kim im Jahre 1991 beschrieben. Kurz vorher waren durch Akowitz und Manuelidis (1989) und Johnson (1990) zwei ähnliche Techniken publiziert worden.

Akowitz und Manuelidis bezeichneten ihre Methode als *primer-directed enzymatic amplification* und nutzten diese für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus kleinen Mengen *messenger-RNA* (mRNA). Hierbei kam ein doppelsträngiges Oligonukleotid zum Einsatz, das aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden mit je zwölf bzw. 19 Nukleotiden (12- bzw. 19-mer)

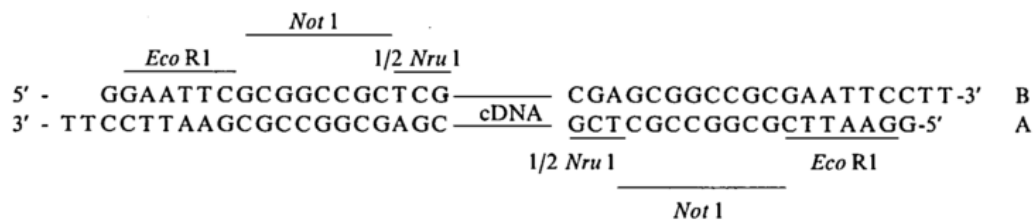


zusammengesetzt ist. Das Molekül, als sogenannter Linker-Adapter bezeichnet, wies also einen Überhang von sieben Nukleotiden auf. Es wurde an doppelsträngige *blunt-ended* cDNA unbekannter Sequenz angehängt bzw. ligiert. Die cDNA mit Linker wurde nachfolgend in einer PCR verwendet, in der das einzelsträngige 19-mer, das bereits als Oligonukleotid im Linker-Molekül Eingang gefunden hatte, als Primer genutzt wurde. Der Primer erkannte das zu ihm komplementäre 12-mer des Linkers. Auf diese Weise konnte die cDNA unabhängig von ihrer Sequenz amplifiziert werden (Akowitz und Manuelidis, 1989).

Johnson wendete eine ähnliche Methode an. Jedoch wurde die Ligation mit kohäsiven Enden durchgeführt. Dies war einerseits durch Restriktionsenzymverdau der DNA und andererseits durch Konstruktion eines Adaptermoleküls mit einem zur Restriktionsschnittstelle komplementären Ende möglich (Johnson, 1990).

Die SISPA soll durch Zielsequenzmodifikation (d. h. durch Adapterligation) heterogene DNA unselektiv und logarithmisch amplifizieren können. Dies steht im Gegensatz zur klassischen PCR, die unter Einsatz spezifischer Primer die Amplifikation homologer bzw. spezifischer Sequenzen unter Ausschluss aller anderen vorliegenden Sequenzen zum Ziel hat. Dies soll die Methode besonders tauglich machen für die Identifizierung von Nukleotidsequenzen, die zum einen unbekannt, zum anderen in begrenzter Menge vorhanden und somit durch einfaches Klonieren naiver DNA schwierig aufzudecken sind. Der genannte Sachverhalt trifft speziell auf die Isolierung von bisher unbeschriebenen Viren zu. Sehr ähnlich zur *primer-directed enzymatic amplification* (Akowitz und Manuelidis, 1989) beinhaltet die SISPA die direktionale Ligation eines asymmetrischen Linkers (AB) an beide Enden von *blunt-ended* cDNA. Somit entstehen Moleküle mit gleicher Endsequenz. Wenn nun ein Strang des doppelsträngigen Linkers als Primer in der nachfolgenden PCR verwendet wird, können alle DNA-Stränge, die zuvor mit dem Linker verknüpft worden sind, amplifiziert werden, da der Primer zu den Enden der DNA komplementär ist.

Abbildung 4 zeigt das Adaptermolekül AB wie es nach Reyes und Kim verwendet wurde. Es weist Restriktionsenzymschnittstellen (EcoRI und NotI) für die Ligation der Amplifikate in einen Kloniervektor auf. Zusätzlich dazu enthält der Primer eine halbe NruI-Schnittstelle, um mögliche Adapterdimere durch NruI-Verdau entfernen zu können (Reyes und Kim, 1991).



**Abb. 4: Sequenz und Struktur des Linkermoleküls AB der SISPA-Methode nach Reyes und Kim (1991)**

Linkermoleküle flankieren die Enden von cDNA-Molekülen und ermöglichen eine sequenzunabhängige Amplifikation. Die Restriktionsschnittstellen EcoR1 und Not1 dienen der Ligation mit einem Kloniervektor, Nru1 entsteht durch Dimerbildung des als Primer verwendeten Oligonukleotids A und wird zur Dimerspaltung genutzt. Quelle: Reyes und Kim, 1991

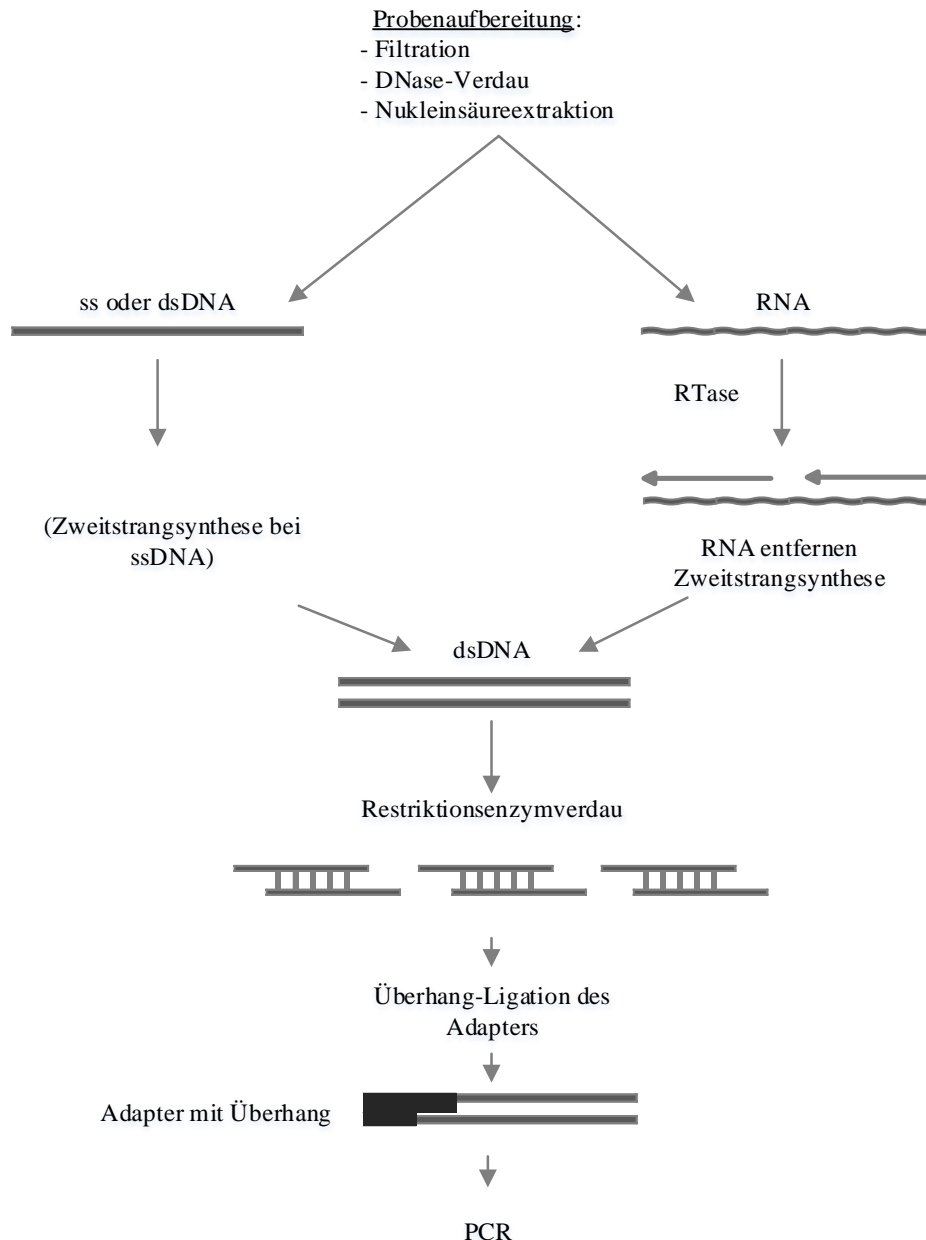
Die Tatsache, dass der relative Anteil an viraler Nukleinsäure in einer zu testenden Probe weitaus geringer ist als der Anteil an Wirts- und eventueller kontaminierender bakterieller Nukleinsäure, schränkt die Erfolgsaussichten durch unselektive Amplifikation virale Nukleinsäure aufzudecken stark ein und limitiert somit den Nutzen der SISPA (Reyes und Kim, 1991; Clem *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2014). Neben eines Amplifikationsschritts bedarf es deshalb zusätzlich einer Selektion, denn das Ergebnis nachfolgender molekularer Ansätze wird sowohl durch die absolute als auch durch die relative Konzentration viraler im Vergleich zu nichtviraler Nukleinsäure beeinflusst (Allander *et al.*, 2001; Tang und Chiu, 2010).

Allander *et al.* (2001) erweiterten die Methodik der SISPA (Abbildung 5) um Schritte zur Selektion bzw. Anreicherung von Virus. Dies erreichten sie durch Vorbehandlung ihres Probenmaterials (Serum) mithilfe von Filtration und enzymatischem Verdau nichtviraler DNA durch eine Desoxyribonuklease (DNase). Beides fand vor der Nukleinsäureextraktion statt. Die verwendeten Filter wiesen eine Porengröße von 0,22 µm auf. Mit derartigen Filtern lassen sich Partikel höherer Dichte und Masse wie Bakterien, eukaryotische Zellen oder Fragmente davon abtrennen (Stang *et al.*, 2005). Durch die enzymatische Behandlung mit einer DNase wird der relative Anteil viraler Nukleinsäure erhöht, da freie DNA abgebaut wird (Prince *et al.*, 1998), Nukleinsäure viraler Herkunft jedoch durch Kapside und im Fall behüllter Viren durch eine Lipidmembran vor enzymatischem Abbau geschützt sei. Sie nannten ihre Methode daher DNase-SISPA (Allander *et al.*, 2001).

Neben einer Steigerung der Selektivität für virale Nukleinsäure durch geeignete Vorbehandlung modifizierten Allander *et al.* die ursprüngliche SISPA-Methodik

durch Hinzufügen eines weiteren Schrittes. Nach Extraktion der Nukleinsäure wurde diese mit bestimmten Restriktionsendonukleasen verdaut (Allander *et al.*, 2001). Dies hatte den Hintergrund, dass die meisten DNA-Fragmente für eine effektive Amplifikation zu lang sind. Durch einen Restriktionsenzymverdau kann die Komplexität der Nukleinsäuren verringert werden (Lisitsyn *et al.*, 1993). Für die sequenzunabhängige PCR konnten somit Verhältnisse geschaffen werden, die die Amplifikation viraler Sequenzen begünstigen würde, denn aufgrund der großen Anzahl und geringen Komplexität des viralen Genoms wurde angenommen, dass ein Restriktionsenzymverdau große Mengen einer begrenzten Anzahl an Fragmenten hervorbringen würde, die nach ihrer Amplifikation als klare Gelbanden sichtbar werden sollten. Im Gegensatz dazu sollte das größere und komplexere Genom des Wirts oder von Bakterien durch einen solchen Verdau in viele verschieden große Fragmente gespalten werden, die nach Amplifikation kontinuierlich in einem Gel aufgetrennt und sich somit als sogenanntes Schmier darstellen würden (Allander *et al.*, 2001). Zusätzlich kann durch Schaffung kohäsiver Enden der Ligationsvorgang effizienter gestaltet werden (Taheri *et al.*, 2012).

Weitere Anreicherungstechniken umfassen unter anderem die Homogenisierung von Gewebeproben, Tangentialflussfiltration, Polyethylenglykol-Präzipitation, Dichtegradientenzentrifugation mit Cäsiumchlorid, Sucrose oder Cäsiumsulfat sowie eine Chloroform-Behandlung zur Zerstörung mitochondrialer Membranen, um die enthaltene DNA für enzymatische Spaltung erreichbar zu machen. Letzteres führt jedoch zum Verlust der Virushülle, wobei die dann unbehüllten Kapside mancher Viren einer DNase-Behandlung nicht standhalten können (Breitbart und Rohwer, 2005; Thurber *et al.*, 2009).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der DNase-SISPA-Methode nach Allander *et al.*, 2001**

**ssDNA/ dsDNA:** *single-stranded/ double-stranded* DNA (einzelsträngige/ doppelsträngige DNA); **SISPA:** *sequence-independent single primer amplification*; **DNase:** Desoxyribonuklease; modifiziert nach Ambrose und Clewley, 2006

Es wurden einige Variationen der SISPA-Methode veröffentlicht. Lambden *et al.* (1992) publizierten eine SISPA-ähnliche Methode zur Amplifikation des Genoms von dsRNA-Viren. Sie verwendeten ein Fragment des Humanen Rotavirus C, ligierten ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das eine Aminogruppe am 3'-Ende trug, um dessen Verkettung zu verhindern, an jedes 3'-Ende der dsRNA. Nach deren Denaturierung wurde ein zweites Oligonukleotid, das komplementär zum

ersten war, hinzugefügt. Somit entstanden einzelsträngige RNA-Moleküle mit doppelsträngigen Enden. Sie wurden nachfolgend für die cDNA-Synthese verwendet. Nach der Erststrangsynthese folgte die Entfernung des RNA-Strangs des cDNA-/RNA-Hybrids. Die cDNA-Stränge wurden aneinandergelagert und repariert. Somit erhielt man doppelsträngige cDNA unbekannter Sequenz. Diese konnte unter Verwendung des zweiten Oligonukleotids als Primer amplifiziert werden (Lambden *et al.*, 1992).

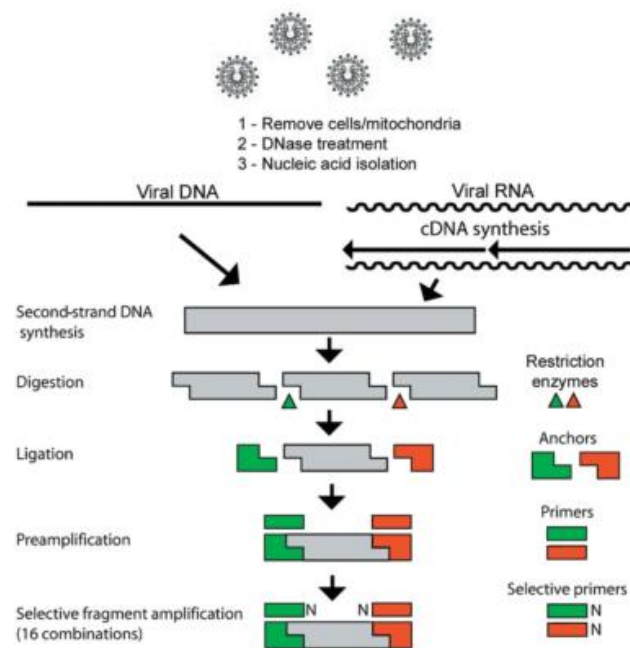
Vreede *et al.* (1998) entwickelten diese Methode weiter, so dass die Amplifikation von 3 – 4 Kilobasen (kb) großen cDNAs aus viraler dsRNA möglich wurde. Entscheidend hierfür war die Ligation eines einzelsträngigen Oligonukleotids mit einer 3'-Aminogruppe und einem zusätzlichen 3'-Poly(dA)-Ende an der dsRNA, um die cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern durchführen zu können. Somit konnte das gesamte vorliegende Genomsegment kopiert werden.

Im Zusammenhang mit der Entdeckung eines neuen humanen Coronavirus (HCoV-NL63) wurde eine weitere Variante der SISPA verwendet. Sie wurde als *Virus-Discovery-cDNA-AFLP*, kurz VIDISCA, bezeichnet (van der Hoek *et al.*, 2004) und ähnelt der Methodik der *amplified fragment length polymorphism fingerprinting*-(AFLP)-Technik (Vos *et al.*, 1995). Das unbekannte Virus konnte in Zellkultur angezüchtet werden, so dass durch Zentrifugation eine Anreicherung der Viruspartikel möglich war. Nach DNase-Inkubation, Nukleinsäureextraktion und cDNA-Synthese wurde eine modifizierte Variante des cDNA-AFLP durchgeführt (s. Abbildung 6).

Doppelsträngige cDNA wurde mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten (MseI, HinP1I) und mit zwei verschiedenen doppelsträngigen Adaptermolekülen, den sogenannten MseI- bzw. HinP1I-Ankern ligiert. Sie wiesen je einen Überhang bestehend aus den Erkennungssequenzen der beiden Restriktionsenzyme (TA bzw. GC) auf und konnten so mit den komplementären Enden der DNA ligiert werden. In einer ersten PCR (Präamplifikation) kamen zwei Primer, namentlich MseI- und HinP1I-Standardprimer, zum Einsatz. Die Primer stellten also je einen Einzelstrang des Adaptermoleküls dar. Dies entspricht soweit dem Prinzip der DNase-SISPA nach Allander *et al.* (2001), mit der Ausnahme der Verwendung von je zwei Restriktionsenzymen und Adaptern.

Anschließend wurde eine zweite selektive PCR durchgeführt. Als Primer hierfür dienten MseI-N- und HinP1I-N, was bedeutet, dass die Standardprimer aus der ersten PCR um N - also G, A, T oder C - erweitert worden waren. Somit

existierten pro Primer je vier Varianten und 16 mögliche Kombinationen beider. Für jede Primerkombination erfolgte eine PCR (van der Hoek *et al.*, 2004). Die zweite PCR ist deshalb als selektiv anzusehen, weil durch die Verwendung von Primern, die mit ihrem N-Anteil in die Sequenz der Restriktionsfragmente hineinreichen, nur solche Fragmente amplifiziert werden, die komplementär zum N-Anteil der Primer sind (Vos *et al.*, 1995). Auf diese Weise konnten spezifische Gelbanden produziert werden, die in der Folge durch Klonierung und Sequenzierung als neue Coronaviren identifiziert wurden (van der Hoek *et al.*, 2004).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der VIDISCA-Methode**

**cDNA:** *copy-DNA*; **VIDISCA:** *Virus-Discovery-cDNA-amplified fragment length polymorphism fingerprinting*; **DNase:** Desoxyribonuklease; **Quelle:** van der Hoek *et al.*, 2004

Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige krankheitsassoziierte Viren, die durch Anwendung der SISPA-Methodik oder ihrer Varianten identifiziert werden konnten.

**Tab. 1: Beispiele krankheitsassoziiierter Viren, die durch SISPA und ihre Varianten entdeckt wurden**

Virus	Krankheit	Methoden	Quelle
Rotavirus	Gastroenteritis	<i>Single primer amplification</i> , Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Lambden <i>et al.</i> , 1992
Astrovirus	Gastroenteritis	SISPA und <i>Immunoscreening</i>	Matsui <i>et al.</i> , 1993
GB-Virus C	Nicht bekannt	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Linnen <i>et al.</i> , 1996
Bovines Parvovirus	Nicht bekannt	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Allander <i>et al.</i> , 2001
Humanes Coronavirus NL63	Respiratorische Erkrankung	Zellkultur und VIDISCA	van der Hoek <i>et al.</i> , 2004
Parvovirus 4 und <i>small anellovirus</i> 1 + 2	Nicht bekannt	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Jones <i>et al.</i> , 2005
Picornavirus	Fieber unbekannter Herkunft	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Jones <i>et al.</i> , 2007b
Humanes Adenovirus G	Gastroenteritis	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Jones <i>et al.</i> , 2007c
Bungowannah-Virus	Porcines-Myocarditis-Syndrom	SISPA, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Kirkland <i>et al.</i> , 2007

**SISPA:** *sequence-independent single primer amplification*; **VIDISCA:** *Virus-Discovery-cDNA-amplified fragment length polymorphism fingerprinting*; modifiziert nach Ambrose und Clewley, 2006

#### 3.2.2.4. Random-PCR

Die *random*-PCR (rPCR) basiert auf der Verwendung von *random*-Primern. Diese Oligonukleotide besitzen am 3'-Ende einen degenerierten Teil (s. I.3.2.1.3.), der willkürlich an RNA- bzw. DNA-Moleküle bindet, und am 5'-Ende einen konstanten Anteil. Nach dem *Annealing* des 3'-Endes an die Ziel-DNA erfolgt die Elongation des Primers gemäß der vorliegenden Matrize bzw. die Verlängerung der Matrize um die spezifische Sequenz des Primers. Anschließend wird in einer PCR derselbe Primer, jedoch ohne den degenerierten 3'-Anteil verwendet (Froussard, 1992). Somit entfällt die Notwendigkeit eines Ligationsschrittes wie er bei der SISPA-Methode zum Einsatz kommt (Muerhoff *et al.*, 1997).

Froussard setzte 1992 den Grundstein für diese Technik. Er verwendete den

Universal-Primer d-N<sub>6</sub>, wobei N an alle vier Basen (A, C, G, T) binden kann. Dieser wurde zur Synthese doppelsträngiger cDNA verwendet, die demnach wahllos hergestellt worden war. Der Universal-Primer ohne degenerierten Anteil kam in der PCR zum Einsatz (Abbildung 7). Auf diese Weise war es gelungen, aus geringen RNA-Mengen cDNA-Bibliotheken herzustellen, die nachfolgend mit spezifischen DNA-Sonden oder Antikörpern hybridisiert werden konnten. Er nutzte die Methode für den Nachweis retroviraler Nukleinsäuren aus menschlichen Zellkulturen (Froussard, 1992), erwähnte aber auch die erfolgreiche Übertragung der Methode auf DNA (Froussard, 1993). Die gleichen Primer wurden bei der Suche nach dem ätiologischen Agens der gehäuften SARS-Fälle in China im Jahr 2002/2003 verwendet. Durch sie verhärtete sich der Verdacht auf eine Coronavirus-Beteiligung am Krankheitsgeschehen (Peiris *et al.*, 2003).

Universal-Primer d-N<sub>6</sub>  
5'- GCC GGA GCT CTG CAG AAT TC – NNN NNN - 3'

Universal-Primer  
5'- GCC GGA GCT CTG CAG AAT TC- 3'

**Abb. 7: Random-Primer für die *random*-PCR nach Froussard, 1992**

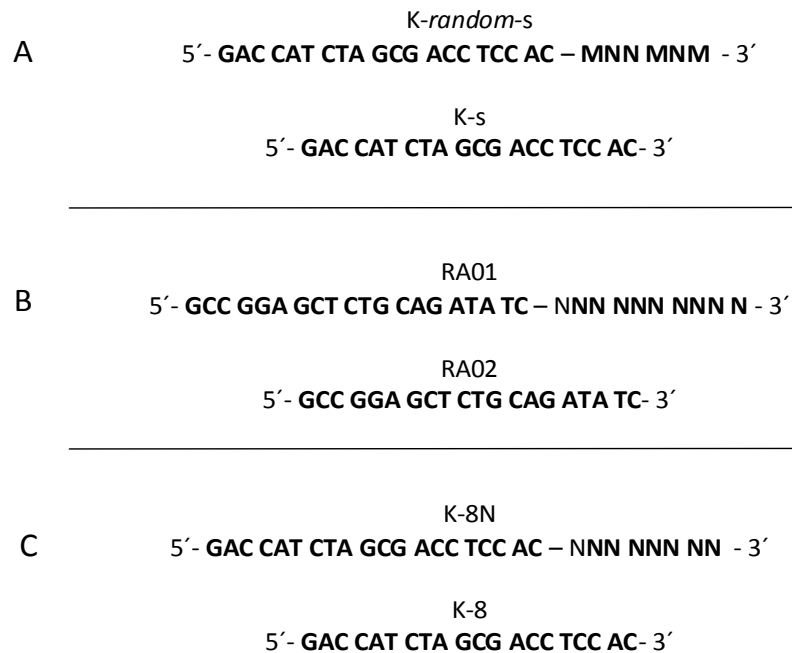
**N = Nukleotide A, C, G oder T**

Stang *et al.* (2005) stellten eine Methode unter der Bezeichnung *particle-associated nucleic acid*-PCR (PAN-PCR) vor, die der *random*-PCR von Froussard sehr ähnlich ist. Bei der partikelassoziierten Nukleinsäure (PAN) handelt es sich um die virale Nukleinsäure in Kapsiden, die durch geeignete Schritte (Ultrazentrifugation, Filtration, Dichtegradientenzentrifugation mit Sucrose und DNase-Verdau) angereichert werden soll. Als *random*-Primer verwenden die Autoren *K-random*-s bzw. *K-s* (Abbildung 8A).

Kapoor *et al.* (2008) setzten ebenfalls nach Anreicherungs-schritten *random*-Primer mit großer Ähnlichkeit zu denen von Froussard ein (1992; s. Abbildung 8B). Es wurden sowohl ein neues Picornavirus bei Meeressäugern (Kapoor *et al.*, 2008), als auch weitere krankheitsassoziierte Viren gefunden (Kapoor *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009a) (s. Tabelle 2).

Victoria *et al.* (2008) nutzten die rPCR mit den Primern K-8N für die cDNA-Synthese respektive K-8 für die darauffolgende PCR (Abbildung 8C). Nach Analyse der Ergebnisse wurde u. a. ein neues Orthoreo- und Orbivirus aufgedeckt.





**Abb. 8:** *Random-Primer* (A) für die PAN-PCR nach Stang *et al.*, 2005, (B) nach Kapoor *et al.*, 2008 und (C) für die *random-PCR* nach Victoria *et al.*, 2008

N = Nukleotide A, C, G oder T; M = A oder C; PAN: *Particle-associated nucleic acid*

Auch von dieser Methodik existieren Variationen. Grothues *et al.* (1993) stellten eine der „klassischen“ rPCR ähnliche Methode vor, die sie *tagged random primer-PCR* nannten. Dafür wurden zwei verschiedene Primer verwendet: zum einen ein *random-Primer* mit degeneriertem und konstantem Teil wie bei der obengenannten rPCR-Technik, zum anderen aber zusätzlich ein Primer, der zum konstanten Teil des *random-Primers* komplementär war. Dies unterscheidet die Technik von der „klassischen“ *random-PCR*, bei der nur ein Primer (mit und ohne degenerierten Anteil) benutzt wurde. Amplifiziert wurde nur solche DNA, die durch die vorhergehende Anwendung des *random-Primers* „getaggt“, also markiert worden war. Es wurde gezeigt, dass damit DNA-Moleküle im Bereich von 400 Basenpaaren bis hin zu 40 Megabasen amplifiziert werden können. Daher soll diese Methode für jegliche DNA-Moleküle geeignet sein, auch wenn diese in kleinen Mengen vorliegen (Grothues *et al.*, 1993).

*Random multiplex Reverse Transkriptase-(RT)-PCR* stellt eine weitere Variante dar. Sie wurde durch Clem *et al.* (2007) als Methode zum schnellen Virusnachweis beschrieben. Die Bezeichnung „*multiplex*“ begründen die Autoren mit der Tatsache, dass während der PCR hunderte überlappende Amplifikationen

gleichzeitig stattfinden. Sie stellten V8AA-*random*-Primer her (Abbildung 9), die aufgrund der Verwendung von zwei Adenosinbasen an ihrem 3'-Ende und der Abwesenheit von Thymidinbasen eine Amplifikation von Primer-Dimeren vermeiden sollen (V = A, C oder G). Gleichzeitig wurde betont, dass im Gegensatz dazu die Verwendung von Primern mit der Nukleotidsequenz 5'-NNNNNNNNNN-3' (N = A, T, G oder C) keine darstellbaren Produkte hervorbrachte. Es wurde gezeigt, dass *random multiplex*-PCR sowohl mit DNA- als auch durch Einfügen eines cDNA-Syntheseschrittes mit RNA-enthaltenden Material durchführbar ist. Jedoch stellte man bei der Durchführung mit RNA-Molekülen eine geringere PCR-Effizienz fest. Es wurde vermutet, dass dies auf die Effizienz der reversen Transkriptase oder die Stabilität der RNA zurückzuführen ist (Clem *et al.*, 2007).



**Abb. 9: Darstellung der *random*-Primer V8AA für die *random multiplex* (RT)-PCR nach Clem *et al.*, 2007**

V = A, C oder G

Tabelle 2 gibt einen Überblick über Beispiele krankheitsassoziiierter Viren, die durch Anwendung der *random*-PCR-Methodik entdeckt wurden.

**Tab. 2: Beispiele von krankheitsassoziierten Viren, die durch *random*-PCR entdeckt wurden**

Virus	Krankheit	Methoden	Quelle
Coronavirus	SARS	<i>Random</i> -PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Peiris <i>et al.</i> , 2003
Bocavirus	Respiratorische Erkrankung?	<i>Random</i> -PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Allander <i>et al.</i> , 2005
Polyomavirus	Respiratorische Erkrankung?	<i>Random</i> -PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Allander <i>et al.</i> , 2007
Picornavirus	Gastroenteritis	<i>Random</i> -PCR, <i>next-generation-sequencing</i>	Li <i>et al.</i> , 2009a
Bocavirus	Enteritis	<i>Random</i> -PCR, Klonierung und Sanger-Sequenzierung	Kapoor <i>et al.</i> , 2009

**SARS: *severe acute respiratory syndrome*; modifiziert nach Ambrose und Clewley, 2006**

## 4. Methoden zur Charakterisierung von PCR-Produkten

### 4.1. Hybridisierung

Der Begriff der Hybridisierung bezeichnet das Aneinanderlagern zweier mehr oder weniger komplementärer Nukleinsäuremoleküle, wobei ein Molekül (Sonde) in seiner Sequenz bekannt ist und eingesetzt wird, um die Ziel-DNA auf ähnliche Sequenzen zu testen (Southern, 1996). Dies kann zum Beispiel im Rahmen eines *Southern Blots* stattfinden. Hierbei wird die Ziel-DNA elektropherographisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, was das sogenannte *Blotting* darstellt. Im Anschluss werden die membrangebundenen DNA-Fragmente mit Sondenmolekülen inkubiert. Diese sind radioaktiv, mit Biotin oder Digoxigenin markiert, wodurch die stattgefundene Hybridisierung sichtbar gemacht werden kann (Southern, 1975; Zavala *et al.*, 2014).

Reyes und Kim quantifizierten die Virusmenge, die durch die ursprüngliche SISPA-Methode generiert werden konnte, durch Hybridisierung. *Copy*-DNA von Bovinem Leukämievirus (BLV) wurde nach SISPA, elektrophoretischer Auftrennung und Southern Blotting mit einer BLV-Hüllproteingen-spezifischen Sonde hybridisiert. Ein positives Ergebnis zeigte sich nur bei der durch SISPA amplifizierten cDNA und bestätigte damit die Tauglichkeit der Methode für die Detektierung viraler Sequenzen, die nur in geringen Ausgangsmengen vorhanden sind (Reyes und Kim, 1991).

Dieselbe Strategie kam im Rahmen der Entdeckung des Hepatitis-E-Virus als Auslöser mehrerer Ausbrüche viraler Hepatitis zum Einsatz (Reyes *et al.*, 1990).

### 4.2. Screening von Expressionsbibliotheken

Mithilfe von Klonierungsvektoren, die die erforderlichen Sequenzen für Transkription und Translation von Fremd-DNA besitzen, können Expressionsbibliotheken erstellt werden. Somit kann von jeder klonierten Fremd-DNA (cDNA) ein entsprechendes Protein hergestellt werden, das zum Beispiel mittels Antikörpern (immunologisches *Screening* einer Expressionsbibliothek) charakterisiert werden kann (Sahin und Tureci, 2013; Zhao *et al.*, 2014).

Das *Immunoscreening* von SISPA-Produkten ermöglichte beispielsweise die genetische Charakterisierung des Norwalk-Virus. Dieses Virus kann bis dato nicht in Zellkultur oder im Tiermodell vermehrt werden, so dass die Elektronenmikroskopie die einzige Diagnosemöglichkeit darstellte.

Massenuntersuchungen oder der Nachweis geringer Virusmengen sind mit dem Elektronenmikroskop jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund bot sich die Anwendung der SISPA nach Reyes und Kim (1991) an. Durch sie erhielt man Klone, deren Spezifität sowohl durch Immunoreaktivität mit postinfektiösen Seren als auch durch Hybridisierung bestätigt werden konnte (Matsui *et al.*, 1991). In ähnlicher Weise wurden immunreaktive Epitope bei humanen Astroviren (Matsui *et al.*, 1993) und ein gemeinsames Epitop bei Enteroviren (Shin *et al.*, 2003) charakterisiert.

Unabhängig von der Amplifikationsmethode muss aufgrund der relativ niedrigen Virusmenge eine hohe Anzahl an Klonen überprüft werden (Allander *et al.*, 2001). So belief sich die Zahl der überprüften Klone im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Norwalk-Virus auf 120000, wobei davon sechs als positiv identifiziert werden konnten (Matsui *et al.*, 1991).

#### **4.3. DNA-Microarrays**

DNA-Microarrays bestehen aus einem festen Trägermaterial, wie z. B. Glas oder einer Nitrocellulose- oder Nylonmembran und basieren auf dem Prinzip der Hybridisierung einer Sonde mit Zielmolekülen in einer Probe. Die Sonden sind dabei fest an den Träger gebunden, während sich die markierten Zielmoleküle in Lösung befinden. Die Hybridisierungen zwischen Sonde und Zielmolekülen können in der Regel durch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, wobei die Intensität der Fluoreszenz der Menge an gebundenen Molekülen entspricht und auf diese Weise eine Quantifizierung möglich ist. Aufgrund der hohen Dichte an gebundenen Sonden unterschiedlicher Sequenz pro Quadratzentimeter wurde die Bezeichnung *Microarray* gewählt (Clewley, 2004).

Es existieren viele potentielle Einsatzgebiete von *Microarrays* (Clewley, 2004). In der Virusdiagnostik können sie sowohl für die Identifizierung einer definierten Gruppe bekannter Viren (Boriskin *et al.*, 2004; Huguenin *et al.*, 2012), für die Resequenzierung bekannter Viren zur Prüfung von Varianten (Lin *et al.*, 2007) oder für die Entdeckung neuer Viren (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003) zum Einsatz kommen. Für letzteres werden panvirale bzw. panmikrobielle *Microarrays* verwendet. Oft werden *Microarrays* mit einem zuvor ablaufenden *random-DNA-Amplifikationsschritt* kombiniert (Wang *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2007). Für weitere Untersuchungen können hybridisierte virale Sequenzen physikalisch abgelöst, amplifiziert, kloniert und sequenziert werden (Wang *et al.*,

2003; Palacios *et al.*, 2007).

Wang *et al.* (2003) konstruierten einen panviralen Oligonukleotid-*Microarray*, der nachfolgend als *Virochip* (Chen *et al.*, 2011) bezeichnet wurde. Er setzte sich aus 70-mer-Oligonukleotiden zusammen, die jeweils die am höchsten konservierten Regionen eines jeden komplett sequenzierten viralen Genoms der *GenBank* darstellen sollten (s. II.4.4.3.; Stand: August 2002, 934 Genome). Dies diente dem Zweck, möglichst viele bekannte als auch unbekannte Viren durch Hybridisierung bzw. Kreuzhybridisierung zu entdecken. Der aktuelle *Virochip* umfasst ca. 36000 Sonden, die von ca. 1500 Viren abstammen (Stand: Dezember 2009) (Chen *et al.*, 2011). Der *Virochip* kam u. a. bei der Identifizierung des SARS-Coronavirus (Ksiazek *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) und bei der Entdeckung des aviären Bornavirus als ätiologisches Agens der neuropathischen Drüsenmagendilatation der Papageien zum Einsatz (Kistler *et al.*, 2008).

*GreeneChip* ist eine Plattform, die sowohl als panviraler als auch als panmikrobieller *Microarray* entwickelt wurde. Der panmikrobelle *GreeneChip* enthält über 29000 60-mer-Oligonukleotidsonden für Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten von Vertebraten und bedient sich einer Kombination aus verschiedenen Datenbanken (Palacios *et al.*, 2007).

Der *Lawrence Livermore Microbial Detection Array* stellt einen weiteren Array für Viren und Bakterien dar (Gardner *et al.*, 2010).

Trotz ihrer Tauglichkeit zur Identifizierung neuer Stämme und einer weiten Spanne an Pathogenen sind *Microarrays* dennoch durch die Sequenzinformationen eingeschränkt, die zum Zeitpunkt ihrer Erstellung zur Verfügung stehen (Chiu, 2013). Im Vergleich zur Sequenzierung (II.4.4.) hat die Analyse anhand von *Microarrays* den zusätzlichen Nachteil, dass Sonden, die ausgehend von bekannten Sequenzen konstruiert worden sind, sehr wahrscheinlich keine wirklich neuen Organismen aufdecken werden, da Sequenzhomologien zu ihnen fehlen (Gardner *et al.*, 2010).

#### **4.4. Sequenzierung und Datenbankabgleich**

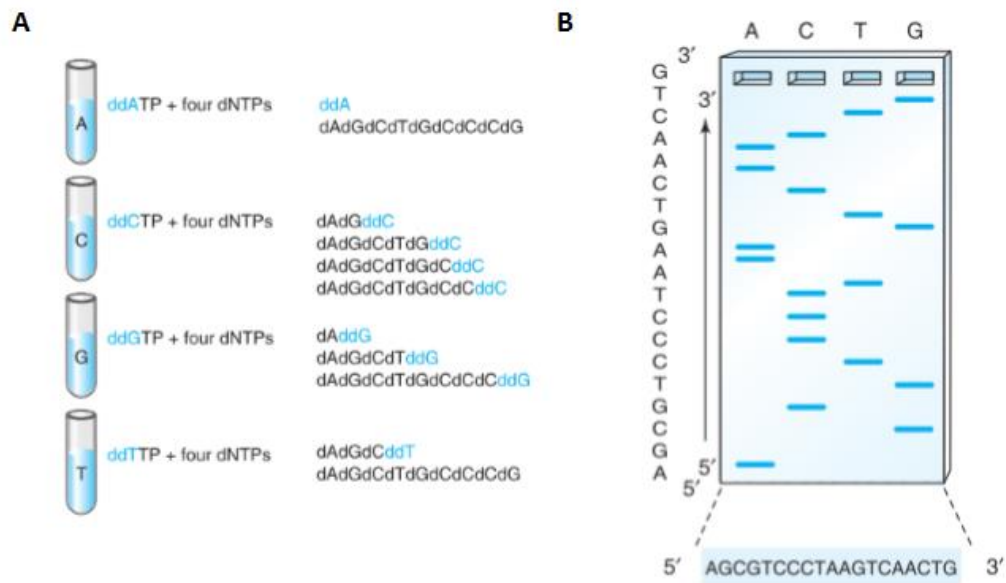
Die Sequenzierung von Nukleinsäure-Molekülen stellt eine Hauptsäule der biologischen Forschung dar (Mc Ginn und Gut, 2013) und ist zur Kerntechnologie der Genomik geworden (Koboldt *et al.*, 2013).

#### 4.4.1. Sequenzierungsverfahren und deren Automatisierung

Die ersten bekannten Sequenzierungsverfahren waren die chemische Methode nach Maxam-Gilbert und die enzymatischen Methode nach Sanger, die auch als Dideoxy- oder Kettenabbruchmethode bezeichnet wird. Die Methode nach Maxam-Gilbert ist technisch aufwendig, lediglich für die Sequenzierung kurzer Fragmente (<100 bp) geeignet und bedarf des Einsatzes gesundheitsgefährdender Chemikalien (Morey *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde sie weitgehend durch die Sanger-Methode ersetzt (Buckingham, 2007). Die Sanger-Methode stellte nach ihrer Einführung im Jahr 1977 für die nächsten drei Jahrzehnte den Goldstandard für die Sequenzierung dar (Mc Ginn und Gut, 2013) und kam im Rahmen der Sequenzierung des menschlichen Genoms zum Einsatz (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Das grundsätzliche Prinzip der Sequenzierung nach Maxam-Gilbert besteht darin, DNA in vier getrennten Ansätzen unter Einsatz verschiedener Chemikalien basenspezifisch zu spalten und durch nachfolgende getrennte Polyacrylamid-gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufzutrennen. Die Basenabfolge wird mithilfe des Bandenmusters, auch als Sequenzierleiter bezeichnet, von unten nach oben abgelesen (Maxam und Gilbert, 1977).

Bei der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (s. Abbildung 10) werden synthetisch hergestellte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) genutzt, die zusätzlich zu den normalen Desoxyribonukleotiden (dNTPs) für die DNA-Synthese verwendet werden. DdNTPs besitzen keine 3'-Hydroxyl-Gruppe. Mit ihrem Einbau wird die DNA-Synthese beendet, da durch das Fehlen dieser Hydroxylgruppe keine Phosphodiesterbrücke für die Verknüpfung eines weiteren Nukleotids ausgebildet werden kann. Verwendet man beispielsweise ein Didesoxythymidin (ddTTP) und ein Gemisch aus allen vier dNTPs zusammen mit einem Primer und einer DNA-Polymerase zur Komplementärstrangsynthese eines DNA-Einzelstrangs, so stoppt die Reaktion nach dem Einbau von ddTTP. Es entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die alle mit einer Thymidinbase enden. Diese Fragmente können elektrophoretisch aufgetrennt werden und spiegeln die Verteilung von Thymidin in der neu synthetisierten DNA wider. Führt man diese Reaktion gesondert für alle ddNTPs durch und trennt sie parallel in einem Gel auf, kann man anhand des Bandenmusters die Sequenz ablesen (Sanger *et al.*, 1977).



**Abb. 10: Darstellung der Kettenabbruchmethode nach Sanger**

**(A) DNA-Synthese getrennt nach ddNTPs; (B) Polyacrylamidgelelektrophorese der Ansätze aus (A). Anhand des entstandenen Bandenmusters (Sequenzierleiter) kann von unten nach oben die Sequenz abgelesen werden. ddA/C/G/TTP: jeweilige Didesoxyribonukleotide; dNTPs: Desoxyribonukleotide; modifiziert nach Buckingham, 2007**

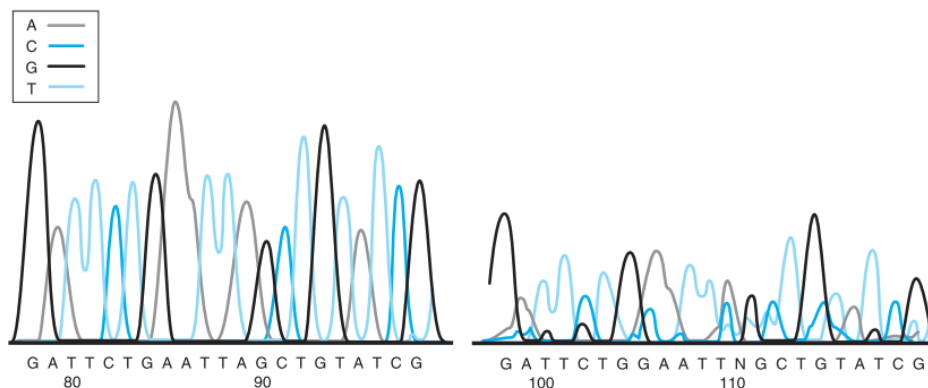
Die Technologie der Sequenzierung wurde seit den ersten routinemäßig durchgeführten manuellen Verfahren durch den Einsatz thermostabiler Enzyme und durch die Anwendung von Thermocyclern maßgeblich verbessert, sodass alle Schritte automatisiert erfolgen.

Anstelle der ursprünglichen radioaktiven Markierung erfordern automatische Systeme den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Differenzierung der Nukleotide erfolgt dabei auf Basis verschiedener Farben bzw. emittierter Wellenlängen. Somit kann die Analyse der Sequenz in nur einer Gelspur bzw. einer Kapillare erfolgen, was eine Arbeitersparnis und zugleich eine Verbesserung der Analysegenauigkeit bedeutet.

Bei der Elektrophorese werden die Fragmente der Größe nach aufgetrennt und von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird wiederum von einem Detektor aufgenommen, in ein elektrisches Signal umgewandelt und als Elektropherogramm dargestellt (s. Abbildung 11). Angefangen vom kleinsten Fragment, das den Detektor am schnellsten passiert, wird die Fluoreszenz als Serie von *peaks* der verschiedenen Farbstoffe ausgelesen. Dieser Vorgang wird als *basecall* bezeichnet. Im Elektropherogramm werden jedem Fluoreszenzfarbstoff eine Farbe und ein Buchstabe zur einfacheren Interpretation zugewiesen.

Die Qualität der Sequenz wird dargestellt durch eine klare *baseline*, d. h. Höhe und Trennung der *peaks*, und bestimmt durch die Qualität des Ausgangsmaterials, durch die Effizienz der Sequenzierreaktion und den Reinheitsgrad der Sequenzierleiter. Sie nimmt regelmäßig am Anfang und Ende ab (Buckingham, 2007).

Mit modernen Geräten können 1000 Basen an Sequenzinformation von bis zu 384 Proben mit einem Durchsatz von 80 – 100 kb pro Stunde (Morey *et al.*, 2013) und einer Durchschnittsgenauigkeit von 99,4 Prozent (Margulies *et al.*, 2005) sequenziert werden.



**Abb. 11: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms guter (links) und schlechter Qualität (rechts)**

Eine gute Qualität zeichnet sich durch eine klare *baseline* (ein *peak* pro Nukleotidposition) aus. Quelle: Buckingham, 2007

#### 4.4.2. *Next-generation-sequencing*

Das 2004 formulierte und mittlerweile fast erreichte Ziel des 1000-Dollar-Genom-Programms, nämlich ein komplettes Säugetier-Genom für 1000 US-Dollar sequenzieren zu können, hat die Suche nach neuen Sequenzierungswegen angetrieben (Hayden, 2014; Sheridan, 2014).

Die *next-generation-Sequenzierung* (NSG) stellt eine Weiterentwicklung der Sequenzierungstechnologie dar. Darauf basierend wird die Sanger-Sequenzierung als *first-generation-Sequenzierung* bezeichnet (Firth und Lipkin, 2013). NGS bedeutet für die Pathogendiagnostik eine Analyse mehrerer Millionen Sequenzen aus der Nukleinsäure einer klinischen Probe, um pathogenassoziierte Sequenzen zu finden. Dies sei zu vergleichen mit der metaphorischen Suche der Nadel im Heuhaufen (Chiu, 2013).

Als Anspielung auf die gewaltige Datenmenge, die mit NGS generiert werden kann, werden die Begriffe *high-throughput-Sequenzierung* (Willner und Hugenholtz, 2013), *deep sequencing* (Chiu, 2013) und *massively parallel-sequencing* (Mardis, 2011) synonym verwendet.



Trotz unterschiedlichster Plattformen gibt es einige gemeinsame Schritte. Zur Erstellung einer Bibliothek wird die DNA zuerst fragmentiert, um diese Fragmente dann durch PCR-Techniken (*Bridge*-PCR oder Emulsions-PCR) klonal zu vervielfältigen. Somit entfällt die Notwendigkeit der Klonierung in Bakterien. Daraufhin folgt die - je nach Plattform unterschiedliche - Sequenzierung. Ihnen allen gemeinsam ist die zyklische und parallele Basenabfrage verbunden mit der Signaldetektierung durch ein optisches System bestehend aus Mikroskop, Kamera, Computer und Speichersystem. Die Länge der Sequenzen variiert zwischen 35 und 700 bp mit üblicherweise durchschnittlich 100 bp (Morey *et al.*, 2013).

Beispiele für verwendete Plattformen sind der frühere *Pyrosequencer* von 454 *Life Sciences*, der heute als *Roche GS FLX Titanium* und *GS Junior Systems* verwendet wird und die Technik der Pyrosequenzierung nutzt (Ronaghi *et al.*, 1996; Margulies *et al.*, 2005; Firth und Lipkin, 2013), *Illumina*-Plattformen mit der *sequencing-by-synthesis*-Technik (Fuller *et al.*, 2009) oder die *Applied Biosystem SOLiD*-Plattform mit der *sequencing-by-ligation*-Methode (Pandey *et al.*, 2008).

Die Möglichkeit der Generierung sehr großer Datenmengen hat negative Einflüsse auf Genauigkeit, Qualität und Durchschnittslänge der erzeugten Sequenzen im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung (Barzon *et al.*, 2013). Die Speicherung und Analyse des immensen Datenvolumens bereitet nicht nur ein lokales Speicherproblem, sondern verkompliziert auch die Weitergabe und Ablage in öffentlichen Datenbanken. Beispielsweise produziert ein durchschnittlicher Sequenzierungsdurchgang mit der *HiSeq*-Plattform der Firma *Illumina* mindestens 2 Terabyte an Daten und tatsächlich fallen die Kosten für die Sequenzierung schneller als die Kosten für die Speicherung (Baker, 2010; Morey *et al.*, 2013; Willner und Hugenholtz, 2013; Hayden, 2014) ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)). Die Verarbeitung, Analyse und Interpretation der Daten benötigt spezielle Expertise im Bereich der Bioinformatik und muss in der Regel durch Informatiker mit ausreichender Ausstattung an Hard- und Software erfolgen. Aufgrund der im Vergleich zur Sangersequenzierung kürzeren Sequenzen müssen längere zusammenhängende Sequenzen, sogenannte *contigs*, erstellt werden, was entweder durch Überlappungen einzelner Sequenzbruchstücke (*reads*) oder durch Subtraktion nichtviraler Sequenzen mithilfe eines Referenzgenoms erreicht werden kann. Dabei ist zu bedenken, dass die Proben nicht nur einen hohen

Gehalt an kontaminierender Wirts-DNA aufweisen, sondern in der Regel mehrere Viren- oder Bakteriengenome enthalten, was zu Lücken in dem zu findenden Zielgenom und zu chimärischen *contigs* (bestehend aus mehreren Quellgenomen) führen kann. Aufgrund der geringeren Sensitivität des NGS können daher PCR und Zyklussequenzierung nach dem automatisierten Sangerverfahren zur Pathogendiagnostik vor allem bei niedrigen Mengen an viralem Material vorteilhafter sein (Barzon *et al.*, 2013; Firth und Lipkin, 2013). Trotz des hohen Durchsatzes des NGS ist es für die meisten Fragestellungen weder nötig noch kosteneffizient das ganze Genom eines Organismus zu sequenzieren (Morey *et al.*, 2013).

Weitere Nachteile stellen die hohe Kontaminationsgefahr und die Verwendung der PCR als mögliche Quelle von *bias* dar (Acinas *et al.*, 2005; Morey *et al.*, 2013).

Das NGS wird also die konventionelle Virologie nicht ersetzen können. Die Virusisolierung in der Zellkultur, Diagnostik mit molekularen Methoden und genetische Analysen durch die Zyklussequenzierung werden wohl auch in den nächsten Jahren Routinemethoden bleiben. Das NGS kann aber als wertvolle Ergänzung zu den genannten Methoden dienen (Barzon *et al.*, 2013).

In der Zwischenzeit wird bereits an der Entwicklung von *third* (TGS)- und *fourth-generation*-Sequenzierungstechnologien gearbeitet (Mc Ginn und Gut, 2013). Während letztgenannte Techniken (*In-situ*-Sequenzierung) noch sehr experimentellen Charakter haben, wird der Hauptvorteil des TGS darin gesehen, einzelne DNA-Moleküle mithilfe der Nanoporen-Technologie ohne vorherige klonale Amplifikation sequenzieren zu können (Mc Ginn und Gut, 2013; Morey *et al.*, 2013).

Aktuell (Stand April 2014) belaufen sich die Kosten für die Sequenzierung eines kompletten menschlichen Genoms durch NGS auf ca. 5000 US-Dollar (Wetterstrand, 2014).

#### **4.4.3. Datenbankabgleich**

Ein Datenbankabgleich basiert auf der Hypothese, dass neue Pathogene Homologien zu bekannten Pathogenen aufweisen (Firth und Lipkin, 2013). Die gebräuchlichste Methode zur Identifizierung unbekannter Pathogene ist die Suche nach Homologien durch einen Abgleich mit allen bekannten Erregern in einer Gendatenbank, wie zum Beispiel der *GenBank* (Benson *et al.*, 2013), unter

Verwendung von *Basic Local Alignment Search Tool*-Programmen, kurz BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Firth und Lipkin, 2013). *GenBank* ist eine Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) des *National Institute of Health*, die öffentlich zugängliche DNA-Sequenzen von fast 260000 Spezies enthält. Die Sequenzdaten stammen von individuellen Wissenschaftlern sowie von Sequenzierzentren oder sie sind herausgegebene Patente des US-Patentamts. Zudem ist die *GenBank* als Mitglied der *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* im täglichen Datenaustausch mit ihren Partnern, nämlich der *European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database* (Leinonen *et al.*, 2011) und der *DNA Data Bank of Japan* (Kaminuma *et al.*, 2011). Die häufigsten Analysen der Datenbanken erfolgen mit dem Zweck Sequenzhomologien zu suchen, was durch BLAST realisiert werden kann. Die BLAST-Suche kann entweder über das *NCBI-Webinterface* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) (Johnson *et al.*, 2008) oder über eigenständige Programme erfolgen (Benson *et al.*, 2013).

BLAST beinhaltet verschiedene Programme zur Überprüfung von Nukleotid- und Proteindatenbanken mit unterschiedlichen Algorithmen auf Sequenzhomologien (McGinnis und Madden, 2004). Zu diesem Zweck werden nicht nur die *GenBank* mit ihren sämtlichen Untereinheiten, sondern auch andere Quellen des NCBI zum Abgleich herangezogen, wie z. B. *Reference Sequence Project* (Tatusova *et al.*, 2014) oder *Clusters of Orthologous Groups of proteins* (Tatusov *et al.*, 2003). Darüber hinaus werden zusätzlich weitere Datenbanken wie *Pfam* (Finn *et al.*, 2014), *Protein Data Bank* (Bernstein *et al.*, 1977) oder *Universal Protein Resource* (*UniProt Consortium*, 2014) abgefragt (BLAST *Programm Selection Guide*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/producttable.shtml>). Die Suche auf Nukleotidebene (BLASTN) kann bei Sequenzen mit großer Abweichung unter Umständen ohne Treffer bleiben; eine Suche auf Proteinebene (BLASTX) lässt möglicherweise fernere Verwandtschaften erkennen (Firth und Lipkin, 2013).

### III. GEWÄHLTE STRATEGIEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Ätiologie einer Infektionskrankheit zu verstehen ist die Grundlage für jedes weitere medizinische Handeln, sei es Therapie, Diagnostik oder Prophylaxe. Im Alltag der Diagnostik treten jedoch immer wieder klinische Fälle auf, deren zugrundeliegende Erreger aus verschiedensten Gründen unaufgedeckt bleiben. Weitergehende Wege zur Erregeridentifizierung bleiben aufgrund arbeitstechnischer und finanzieller Aspekte oft unbesritten. Dies trifft im Besonderen auf die Veterinärmedizin zu, in der die Wirtschaftlichkeit oder die persönlichen Mittel nicht selten den limitierenden Faktor für wissenschaftliche Bemühungen darstellen. Um diesem Sachverhalt zu begegnen, sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden zur Identifizierung neuer bzw. unvermuteter DNA-Viren getestet und verglichen werden, deren Umsetzung in einem durchschnittlichen Labor realisierbar ist. Dies bezieht sich einerseits auf die gerätetechnische Ausstattung, andererseits auch auf das nötige Hintergrund- bzw. Spezialwissen. Die Methoden sollten kostengünstig, schnell und unkompliziert, reproduzierbar und für verschiedenartige Proben mit überwiegend vorhandenen Geräten und Reagenzien einsetzbar sein. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sie Eingang in die Routinediagnostik finden könnten, um das Repertoire an Diagnostikmöglichkeiten zu erweitern und in geeigneten Fällen eine Alternative zu den gängigen virologischen und molekularen Arbeitsweisen zur Verfügung zu stellen.

Zur Verwirklichung dieser Ziele wurde einerseits die SISPA nach Allander *et al.* (2001) und zum anderen die *random*-PCR mit Primern nach Clem *et al.* (2007) ausgewählt. Als Modell diente das Equine Herpesvirus-1 (EHV-1), ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, das in verschiedenen Geweben bzw. Probenmaterialien von infizierten Pferden gefunden werden kann. Mit beiden Nachweismethoden wurden verschiedene Proben mit absteigender Viruskonzentration und ansteigender Fremd-DNA-Menge untersucht und die Ergebnisse anschließend verglichen. Ziel war es, das Virus nach Anwendung beider Methoden, der Sanger-Sequenzierung und dem Datenbankabgleich via BLAST-Suche wiederzufinden.

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Herstellung des Probenmaterials und *real time*-PCR

Es wurden verschiedene Materialien mit ansteigendem Zellgehalt verwendet, um SISPA und *random*-PCR mit ihren Anreicherungsschritten hinsichtlich deren Tauglichkeit in Anwesenheit variabler Mengen an zellulärer Nukleinsäure zu testen.

EHV-1-haltiger Zellkulturüberstand und infizierte Zellen wurden eigens hergestellt. Alle weiteren Proben stellten klinisches Probenmaterial von EHV-1-infizierten Pferden dar.

#### 1.1. Zellkulturüberstand und Zellen

Zur Herstellung des EHV-1-enthaltenden Zellkulturüberstands (ZKÜ) wurden Zellkulturflaschen (Volumen 250 ml) mit *rabbit kidney* (RK)-13-Zellen beimpft und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Medium diente *Minimum Essential Medium Eagle* mit Hank's Salz, L-Glutamin und Natriumbikarbonat (Sigma-Aldrich) und Penicillin-Streptomycin-Zusatz (Sigma-Aldrich). Am nächsten Tag wurde ein zu 90 Prozent konfluierender Zellrasen (*Monolayer*) mit 50 µl Virussuspension eines Feldisolats mit einem Virustiter von 10<sup>7</sup> KID<sub>50</sub>/ml aus dem Bestand des Diagnostiklabors des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München infiziert. Der beste Zeitpunkt zum Ernten des ZKÜ bzw. der Zellen wurde durch tägliche Probennahme mittels *real time*-PCR (s. IV.1.4.) ermittelt und stellte sich als Tag zwei *post infectionem* (p.i.) heraus. Der ZKÜ wurde nach Entnahme 5 Minuten lang bei 2000 rpm zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen oder Zellfragmente zu entfernen. Für die weiteren Experimente wurde der Überstand bei -20°C gelagert und dann im aufgetauten Zustand verwendet.

Zur Gewinnung der EHV-1-haltigen Zellen wurde eine Flasche der infizierten RK-13-Zellen am Tag zwei p.i. bei -20°C eingefroren. Für die weiteren Experimente wurde anschließend die aufgetaute Zellsuspension, bestehend aus Zellen und Zellkulturüberstand, verwendet, die in Folge der Kältebehandlung kapsidgeschützte Virionen und Zellfragmente samt freier, ungeschützter zellulärer Nukleinsäure enthielt. Somit wurden die Voraussetzungen für den nachfolgenden Enzymverdau durch die DNase (s. IV.3.2.) geschaffen.

## 1.2. Liquor

Die verwendete EHV-1-haltige Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor) stammte aus einem Infektionsversuch mit dem Stamm Ab4 aus Fort Collins, Colorado, USA und wurde einem virämischen Pferd zehn Tage p.i. via atlantookzipitaler Punktion entnommen und anschließend bei -80°C gelagert. Diese Probe wurde freundlicherweise von Professor Dr. Lutz Göhring aus der Klinik für Pferde der LMU München zur Verfügung gestellt.

## 1.3. Gewebeproben

Den Gewebeproben wurde nach einem Frier-Tau-Zyklus ein ca. 3 x 3 x 3 mm großes Stück entnommen und dieses zusammen mit einer Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) und 400 µl *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, Sigma-Aldrich) in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und in einer Laborschwingmühle (Retsch) bei 25 Hertz 1 Minute lang homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 5 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand im Anschluss für die Testung mittels SISPA und *random-PCR* verwendet.

Als Gewebe wurden EHV-1-haltiges Gehirn und Lebergewebe getestet. Beides stellte klinisches Probenmaterial dar. Das Gehirngewebe wurde freundlicherweise von Frau Dr. Antonie Neubauer-Juric (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim) zur Verfügung gestellt. Die Leberprobe entstammte einem EHV-1-infizierten Fetus, der als eingesandte Probe zur Abortabklärung vorlag.

## 1.4. EHV-1-spezifische *real time-PCR*

Eine EHV-1-spezifische *real time-PCR* (Nachweis des gD-Gens nach Goodman *et al.*, 2006) wurde einerseits für die Vorversuche zum Enzymverdau (s. IV.2.), für die quantitative Analyse der EHV-1-Ausgangsmenge in den ursprünglichen Proben und zusätzlich für die Ermittlung des Verlusts viraler DNA nach den jeweiligen einzelnen Behandlungsschritten des SISPA- bzw. *random-PCR*-Protokolls angewendet. Freisetzung, Isolierung, Herstellung des Mastermix und Ansetzen der PCR-Reaktion erfolgten unter räumlicher Trennung.

### 1.4.1. Freisetzung und Isolierung der EHV-1-DNA

Zur Gewinnung viraler DNA wurde das *QIAmp® DNA Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Aufreinigung für zellarme Proben (ZKÜ,

Zellen und Zerebrospinalflüssigkeit) erfolgte nach dem Protokoll für Blut und Körperflüssigkeiten (*Spin*-Protokoll); für die Aufreinigung von Gewebeproben kam entsprechend das Protokoll für DNA-Aufreinigung von Gewebe zum Einsatz. Kurz beschrieben wurden für zellarme Proben 20 µl Proteinase K, 100 µl Probe, 100 µl DPBS und 200 µl Puffer AL in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß 15 Sekunden impuls geschüttelt, 10 Minuten bei 56°C im Thermomixer inkubiert, mit 200 µl Ethanol versetzt und erneut 15 Sekunden impuls geschüttelt. Das Gemisch wurde danach auf die Filtersäule überführt, 30 Sekunden bei 13000 x g zentrifugiert, mit zwei verschiedenen Puffern gewaschen, 1 Minute bei 21000 x g zentrifugiert und anschließend mit 100 µl Elutionspuffer 1 Minute inkubiert und die DNA 30 Sekunden bei 13000 x g in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß losgelöst. Für Gewebe wurde ein ca. 3 x 3 x 3 mm großes Organstück mit 100 µl DPBS und einer Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß 1 Minute bei 25 Hertz in einer Tischschwingmühle homogenisiert, mit 125 µl Puffer ATL und 25 µl Proteinase K vermischt und 30 Minuten bei 56°C und 450 rpm im Thermomixer inkubiert, mit 250 µl Puffer AL versetzt und 10 Minuten bei 75°C inkubiert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 400 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Ab der Ethanolzugabe entsprechen alle weiteren Schritte dem oben aufgeführten Protokoll für zellarme Flüssigkeiten.

#### 1.4.2. Durchführung der PCR

Die Primer und die Sonde wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen, die dazugehörigen Sequenzen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Zur Herstellung des Mastermix wurde das *QuantiTect™ Probe PCR Kit* (Qiagen) verwendet. Die Zusammensetzung des Mastermix, das Temperaturprofil und die Farbkanäle sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tab. 3: Primer und Sonde der *real time*-PCR nach Goodman *et al.*, 2006**

Name		Sequenz
Forward Primer	EHV-1-gD F	5' - TCG CGA TCT TGA GCG TTG T - 3'
	EHV-1	
Reverse Primer	EHV-1-gD R	5' - CCG CAC GCT TGG CTT T - 3'
	EHV-1	
Sonde EHV-1	EHV-1-gD	6-FAM- TCT CTT GTG GAA CAT GC - MGB

Der Mastermix wurde in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß hergestellt und in

einem Vortexmischer kurz aufgeschüttelt und anschließend zentrifugiert. Jeweils 20 µl davon wurden in *real time*-PCR geeignete Reaktionsgefäße (Thermo Fisher) gefüllt und nach Zugabe von je 5 µl des Probeneluats mittels *Optical Caps* (Thermo Fisher) verschlossen. Die Messung der Fluoreszenz fand in MxPro 3000P- und MxPro 3005P-Thermocyclern (Agilent Technologies) während der Extensionsphase statt.

**Tab. 4: Mastermix, Temperaturprofil und verwendete Farbkanäle für die EHV-1-*real time*-PCR nach Goodman *et al.*, 2006**

Mastermix		
PCR Master Mix		12,5 µl
Primer-Sonden-Mix		2 µl
RNase-freies Wasser		5,5 µl
<b>Reaktionsansatz:</b>		20 µl + 5 µl Probe
Temperaturprofil		
Polymeraseaktivierung	1x	15 min bei 94°C
Denaturierung		30 sec bei 94°C
<i>Annealing</i> / Extension	42x	
(Messung)		60 sec bei 60°C
Messung		
EHV-1		FAM
Referenz		ROX

#### 1.4.3. Auswertung

Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der MxPro QPCR-Software (Agilent Technologies). Die Proben wurden auf Grundlage des Ct-Wertes in Relation zueinander gestellt und verglichen. Der Ct-Wert (*threshold cycle* bzw. Schwellenwertzyklus) bezeichnet dabei die Anzahl der PCR-Zyklen, die bei der jeweiligen Reaktion benötigt wird, damit das ansteigende Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet und somit den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve darstellt.

## 2. Vorversuche zum Enzymverdau

Der Einsatz einer DNase im SISPA- bzw. im *random*-PCR-Protokoll dient neben den physikalischen Anreicherungsmaßnahmen auch der relativen Erhöhung der viralen DNA im Probenmaterial durch den Abbau zellulärer und bakterieller DNA



mittels enzymatischer Spaltung. Dabei spielt die schützende Wirkung der Viruskapside eine Schlüsselrolle, denn nur durch diesen Schutzmechanismus kann es zu einem selektiven Abbau kommen. Der Enzymverdau muss daher vor Extraktion der Nukleinsäuren stattfinden, bevor die virale DNA aus den Viruskapsiden freigesetzt wird. Zunächst wurde überprüft, ob die verwendete DNase einerseits zum Abbau der zellulären DNA führen würde und ob andererseits eine protektive Wirkung durch die viralen Kapside vorliegt. Alle Versuchsansätze wurden als Doppelansatz durchgeführt und jeweils als Duplikat mit der EHV-1-*real time*-PCR gemessen.

## **2.1. Wirksamkeit der DNase**

### **2.1.1. Effekt der DNase auf EHV-1-DNA**

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) wurde der Effekt des Enzyms auf freigesetzte EHV-1-DNA aus ZKÜ mittels *real time*-PCR untersucht. Dabei kamen zwei unterschiedliche Enzymkonzentrationen, nämlich 5 µl (= 10 Einheiten) und 10 µl (= 20 Einheiten) zum Einsatz. Nach Filtration (s. IV.3.1.) wurde die DNA aus 150 µl EHV-1-ZKÜ isoliert. 100 µl Eluat wurden anschließend mit 5 bzw. 10 µl DNase und 10 µl Reaktionspuffer 30 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert, gefolgt von einer Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 75°C im Thermomixer. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle, d. h. 100 µl Eluat ohne jegliche Behandlung, und eine Wasserkontrolle, d. h. 10 µl Ribonuklease(RNase)-freies Wasser (Qiagen) anstelle der DNase, mit beschriebener Temperaturbehandlung verwendet. Jeweils 5 µl dieser vier verschiedenen Ansätze dienten als *Template* in der nachfolgenden PCR.

### **2.1.2. Einfluss von Gewebe auf Effekt der DNase auf EHV-1-DNA**

Weiterhin wurde die Effektivität der DNase in Anwesenheit von Gewebe getestet. Gehirngewebe eines Pferdes und fetales equines Lebergewebe wurden dazu mit EHV-1-DNA (aus ZKÜ isoliert) gespikt. Beide Materialien stammten aus den Diagnostikeinheiten des Instituts für Pathologie bzw. des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München und wurden durch *real time*-PCR negativ auf EHV-1 getestet.

Als Kontrollansatz dienten 100 µl reine DNA aufgereinigt aus ZKÜ mit und ohne DNase-Behandlung. Die Aufbereitung der Organproben wurde wie in IV.1.4.

durchgeführt, um dann jeweils 150 µl des zentrifugierten Organüberstands mit 100 µl Eluat aus EHV-1-ZKÜ (= freigesetzte EHV-1-DNA) zu mischen. Dieses Gemisch wurde filtriert und davon jeweils 100 µl Filtrat auf je zwei 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen aufgeteilt. Pro Gewebeart (Gehirn, Leber) wurden je ein Kontrollansatz (ohne DNase-Behandlung) und ein Ansatz mit Enzymverdau durchgeführt. Die gespikten Ansätze wurden erneut einer Extraktion der Nukleinsäuren unterzogen und davon jeweils 5 µl dieses Eluats als *Template* für die nachfolgende *real time*-PCR entnommen.

## **2.2. Nachweis der schützenden Wirkung des Viruskapsids**

Der Effekt der DNase-Behandlung vor und nach Extraktion der Nukleinsäuren sollte verglichen werden. Das Experiment wurde für die EHV-1-enthaltenden Materialien ZKÜ, Gehirn und Leber durchgeführt. Der DNase-Verdau erfolgte für jeweils 100 µl Probenmaterial vor und nach Extraktion der DNA. Zusätzlich wurden für jedes Probenmaterial eine Positiv- und eine Wasserkontrolle hinzugefügt (s. IV.2.1.1.).

## **3. Anreicherung viraler Nukleinsäure und Vorbehandlung des Probenmaterials nach SISPA- bzw. *random*-PCR-Protokoll**

Die unterschiedlichen Probenmaterialien wurden physikalischen und chemischen Methoden zur Anreicherung viraler DNA unterzogen. Die materialspezifischen Behandlungsschritte, wie z. B. Homogenisierung bei Gewebe, sind jeweils dort (IV.1.) beschrieben.

Der Verlust an EHV-1-DNA im Laufe der Probenaufbereitung wurde exemplarisch anhand des EHV-1-ZKÜ durch PCR überwacht. Dazu wurden jeweils 5 µl Probenmaterial nach Filtration, DNase-Verdau, Restriktionsenzymverdau, PCR-Aufreinigung sowie Ligation entnommen und als *Template* für die EHV-1-spezifische *real time*-PCR verwendet. Vergleichend wurde eine Positivkontrolle ohne die genannten Aufreinigungsschritte analysiert.

### **3.1. Filtration**

Die Filtration diente dem Zweck der Abtrennung von Wirts- und Bakterienzellen und deren Fragmenten. Hierzu wurden 2 ml *Costar®-Spin-X®*-Zentrifugen-

Filtersysteme mit einer Porenweite von 0,45 µm aus Zelluloseacetat (Corning Incorporation) eingesetzt. Im Vergleich dazu weist ein Herpesvirus-Virion einen ungefähren Durchmesser von 120 nm auf (Jin *et al.*, 2008) und kann somit die Filtermembran leicht passieren. Die Zentrifugation von 150 µl Probenmaterial erfolgte 1 Minute lang bei 2000 x g. Jeweils 100 µl des Filtrats wurden standardisiert für die weiteren Schritte verwendet.

### 3.2. DNase-Verdau

Bei der *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) handelt es sich laut Herstellerangaben um eine Endonuklease, die Phosphodiesterbindungen hydrolytisch spaltet und für die Behandlung doppelsträngiger DNA sehr gut geeignet ist. Das Enzym ist eine gentechnisch veränderte Form der bovinen DNase I mit 350 Prozent höherer katalytischer Effizienz.

Für das SISPA- und *random*-PCR-Protokoll wurden jeweils 100 µl filtrierte Probenmaterial mit 5 µl DNase und 10 µl Reaktionspuffer vorsichtig gemischt (Vortex), 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 75°C im Thermomixer inaktiviert. Dies fand vor der Extraktion der Nukleinsäuren statt, um zelluläre und mögliche bakterielle DNA zu spalten, virale DNA jedoch durch die Anwesenheit des schützenden Viruskapsids zu erhalten und somit den relativen Anteil viraler DNA im Probenmaterial zu erhöhen.

Zur Extraktion der Nukleinsäuren im Probenmaterial wurde dasselbe Protokoll, wie unter IV.1.4.1. beschrieben, verwendet.

### 3.3. Restriktionsenzymverdau

Die extrahierte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Csp 6.I (Thermo Fisher Scientific) geschnitten. Dieser Schritt war im SISPA-Protokoll erforderlich, um kohäsive Enden für die nachfolgende Ligation zu schaffen. Entsprechend wurde im *random*-PCR-Protokoll zusätzlich zu einem ungeschnittenen Ansatz auch ein restriktionsenzymgeschnittener Ansatz angefertigt.

Das Enzym hat eine Erkennungssequenz von vier Basen (G<sup>A</sup>TAC) und produziert TA-Überhänge. 17 µl DNA-haltiges Eluat wurden mit 2 µl 10 X Reaktionspuffer und 1 µl bzw. 10 Einheiten Enzym angesetzt und 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte 20 Minuten bei 65°C im Thermomixer.

Um kurze Fragmente unter 100 bp zu entfernen und somit die Amplifikation

dieser kleiner Fragmente zu vermeiden, wurde an dieser Stelle im SISPA-Protokoll eine Aufreinigung mittels *Wizard® CV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) durchgeführt. Für die *random*-PCR wurde dieser Schritt sowohl für die ungeschnittene als auch für die restriktionsenzymgeschnittene DNA durchgeführt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Aus diesem Vorgang erhielt man jeweils 50 µl aufgereinigtes Produkt.

### 3.4. Ligation

Die Ligation eines Adaptermoleküls an die *Template*-DNA ist ein essentieller Bestandteil der SISPA-Methode (vgl. II.3.2.2.3.). In der nachfolgenden PCR werden nur Fragmente mit endständigem Adapter vom Primer erkannt und amplifiziert.

#### 3.4.1. Herstellung des Adaptermoleküls

Das Adaptermolekül Ncsp ist, wie bei Allander *et al.* (2001) beschrieben, aus den beiden Oligonukleotiden NBam24 und NCsp11 zusammengesetzt. Diese wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Die Sequenz bzw. Struktur der Oligonukleotide und des Adaptermoleküls sind in Tabelle 5 bzw. in Abbildung 12A zu sehen.

**Tab. 5: Sequenz der Oligonukleotide NBam24 und Ncsp11 für die Herstellung des Adapters Ncsp**

Oligonukleotid	Sequenz
<b>NBam24</b>	5' - AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG - 3'
<b>Ncsp11</b>	5' - TAC TCC CTC GG - 3'

Für die Herstellung der Stammlösung des Adapters (100µM) wurden die Oligonukleotide NBam24 und Ncsp11 unter Zugabe von 1 X TE-Puffer in der Konzentration von 200 µM vorgelegt und mit 5 M Natriumchlorid-Lösung (NaCl) in einem PCR-*Tube* (Thermo Fisher Scientific) gleichmäßig vermischt. Die *Annealing*-Reaktion wurde in einem *peqSTAR 2X* Thermocycler (PEQLAB) durchgeführt (s. Tabelle 6). Die Stammlösung wurde mit 1 X TE-Puffer auf 10 µM verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Tab. 6: Annealing-Reaktion und Temperaturprotokoll zur Herstellung des Adapters Ncsp**

<b>Annealing-Reaktion</b>	
NBam24 (200µM)	20 µl
NCsp11 (200µM)	20 µl
NaCl (5M)	0,8 µl
<b>Ncsp</b> (100 µM)	40,8 µl
<b>Temperaturprotokoll</b>	
10 min bei 65°C, gefolgt von einer Reduktion auf 10°C innerhalb von 2 h (1°C in 2 Minuten)	

**3.4.2. Ligation des Adapters an die *Template*-DNA**

In Vorversuchen zur Ligation wurden verschiedene Temperatur- und Konzentrationsschemata hinsichtlich der Konzentration von Adapter bzw. DNA durchgeführt. Da vermutet worden war, dass sich die Adaptermoleküle unter niedrigen Temperaturen zusammenlagern und somit für die Ligation an die *Template*-DNA nicht zur Verfügung stehen, wurde der Adapter vor der Ligationsreaktion in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß vorinkubiert. Für die Ligation wurden T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) mit 10 X Ligationspuffer und *Template*-DNA zum vorinkubierten Adapter gemischt und kurz aufgeschüttelt (Vortex). Alle Temperaturschritte im Rahmen der Ligation wurden in einem Thermomixer durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ligationsreaktion und das Temperaturprotokoll sind in Tabelle 7 angegeben.

**Tab. 7: Ligationsreaktion und Temperaturschritte**

<b>Vorinkubation</b>	
2 µl Adapter Ncsp	30 min bei 30°C
<b>Ligationsreaktion</b>	
Adapter Ncsp (10µM)	2 µl
DNA	7 µl
T4 DNA Ligase	1 µl (400 Einheiten)
10 X Ligationspuffer	1µl
<b>Inkubation</b>	
über Nacht bei 16°C	

**4. Sequenzunabhängige Amplifikation**

Die Amplifikation der DNA erfolgte sowohl für die SISPA als auch für *random*-PCR sequenzunabhängig. Die Freisetzung unter Anreicherung viraler DNA, die Isolierung sowie das Ansetzen des Mastermix und der PCR-Reaktion erfolgten

räumlich getrennt.

Für die Herstellung des Mastermix wurden *TopTaq™ Master Mix Kit* (Qiagen) und *ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich) verwendet. Die jeweilige Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 8 angegeben.

**Tab. 8: Zusammensetzung der verwendeten PCR-Mastermixe**

	<i>TopTaq™ Master Mix Kit</i> (Qiagen)	<i>ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix</i> (Sigma-Aldrich)
<b>Reaktionsansatz</b>	23µl Mastermix + 2µl Probe	
	<b>Mastermix</b>	
PCR Master Mix	12,5 µl	12,5 µl
Primer	2 µl	1 µl
Wasser	6 µl	9,5 µl
Ladepuffer	2,5 µl	-

Der Mastermix wurde in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß hergestellt und in einem Vortexmischer kurz aufgeschüttelt. Je 23 µl wurden in *PCR-Tubes* (Thermo Fisher Scientific) gefüllt und nach Zugabe von 2 µl Probe verschlossen. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem *peqSTAR 2X* Thermocycler (PEQLAB) durchgeführt.

#### 4.1. SISPA

Für die PCR nach dem SISPA-Protokoll wurde das Oligonukleotid NBam24 als Primer verwendet.

Zur Herstellung des PCR-Primers NBam24 wurde die Stammlösung (200µM) mit 1 X TE-Puffer auf die Konzentration von 10 µM verdünnt, aliquotiert und dann bei -20°C aufbewahrt. Sowohl die Sequenz des Primers NBam24 als auch das Temperaturprotokoll sind in Tabelle 9 angegeben.

**Tab. 9: Sequenz des Primers NBam24 und Temperaturprotokoll für die PCR der SISPA-Methode**

<b>Primer NBam24 (10µM)</b>		
5' - AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG - 3'		
<b>Temperaturprotokoll</b>		
Polymeraseaktivierung	1x	3 min bei 95°C
Denaturierung		30 sec bei 95°C
<i>Annealing</i>	42x	30 sec bei 55°C
Extension		1 min bei 72°C
Extension	1x	5 min bei 72°C

NBam24 bindet während der PCR an das Oligonukleotid Ncsp11, das sich als Teil

des Adaptermoleküls Ncsp am Ende einzelsträngiger DNA-Fragmente befindet. Auf diese Weise können alle DNA-Fragmente mit endständigem Adaptermolekül unabhängig von ihrer Sequenz amplifiziert werden (Abbildung 12).

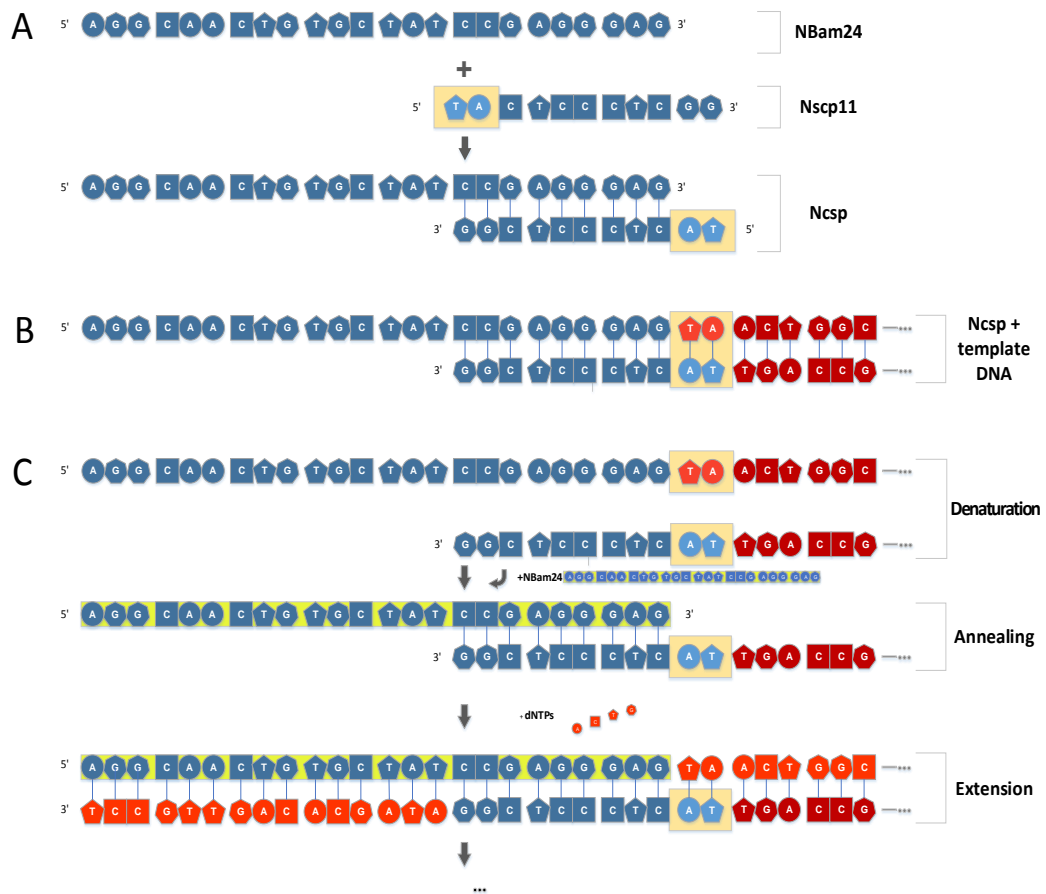


Abb. 12: Schematische Darstellung der SISPA

**A: Herstellung des Adaptermoleküls Ncsp:** Die Oligonukleotide NBam24 und Ncsp11 lagern sich zusammen, wodurch ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit TA-Überhang entsteht. **B: Ligation des Adapters an die Ziel-DNA:** Die *Template*-DNA weist nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease Csp 6.I. einen TA-Überhang auf, der zur Ligation mit dem Adaptermolekül Ncsp verwendet wird. **C: PCR unter Verwendung des Primers NBam24:** Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisiert NBam24 im Bereich des Ncsp11, wodurch die Extension der DNA möglich ist.

#### 4.2. Random-PCR

Für die Amplifikation im *random*-PCR-Protokoll wurde die Stammlösung (100µM) des Primers V8AA (Sigma-Aldrich) mit 1 X TE-Puffer hergestellt und damit auf die Arbeitskonzentration (40µM) verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Basenabfolge des Primers und das PCR-Temperaturprotokoll sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Durch den degenerierten Anteil des Primers (V = A, G oder C) lagert sich dieser sequenzunabhängig an die *Template*-DNA, folglich entsteht eine Vielzahl

unterschiedlich langer PCR-Produkte.

**Tab. 10: Sequenz des *random*-Primers und Temperaturprotokoll für die PCR der *random*-PCR-Methode**

Primer V8AA (40µM)		
5' - VVV VVV VVA A - 3'		
Temperaturprotokoll		
Polymeraseaktivierung	1x	2 min bei 95°C
Denaturierung		30 sec bei 94°C
Annealing	50x	1 min bei 33°C,
Extension		von 34°C auf 57°C (1°C in 6 sec)
		2 min bei 58°C
Extension	1x	5 min bei 65°C

## 5. Charakterisierung der PCR-Produkte

Zur Überprüfung des Erfolgs und zum Vergleich der beiden Methoden war es erforderlich, die in den jeweiligen PCRs entstandenen Produkte zu charakterisieren und zu identifizieren. Zuerst erfolgte eine Sichtbarmachung der Produkte in einem Agarosegel. Ausgewählte Banden wurden anschließend kloniert und sequenziert, um mit den erhaltenen Sequenzen durch eine BLAST-Suche nach Übereinstimmungen in der Nukleotiddatenbank zu suchen. Ziel war das Erhalten von Sequenzhomologien mit EHV-1, um die erfolgreiche Durchführung beider Methoden bestätigen zu können.

### 5.1. Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese

Die in der PCR entstandenen Produkte wurden für ihre weitere Charakterisierung in einem 1,5% Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde eine *Mupid One*-Elektrophoresekammer (Advance) verwendet. PCR-Produkte, bei denen das *ReadyMix<sup>TM</sup>Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich) verwendet worden war, wurden mit je 6 µl 6 X Ladepuffer vermischt. Bei dem *TopTaq<sup>TM</sup> Master Mix Kit* (Qiagen) war der Ladepuffer bereits Bestandteil des Mastermix. Für SISPA- und *random*-PCR-Produkte wurden je 25 µl PCR-Produkt und 10 µl 100-bp-DNA-Leiter verwendet und zur Insertionskontrolle je 10 µl PCR-Produkt und 10 µl DNA-Leitern (*Quick-Load<sup>®</sup> 100 bp* und *1kb DNA Ladder*, New England Biolabs). Die Elektrophorese wurde ca. 80 Minuten bei 50 Volt durchgeführt und das entstandene Bandenmuster im *Chemidoc<sup>TM</sup> MP Imaging System* (Bio-Rad) mithilfe der *ImageLab<sup>TM</sup> Software*, Version 5.0 (Bio-Rad) dokumentiert.



Ausgewählte klare Gelbanden von SISPA- und *random*-PCR-Produkten wurden ab einer Größe von 200 bp unter einem *BIO View Transilluminator* (Biostep) mit einem Einmalskalpell einzeln ausgeschnitten und bis zur weiteren Bearbeitung jeweils in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß im Kühlschrank aufbewahrt.

## 5.2. Klonierung

Da die Gelbanden zwar Fragmente derselben Größe enthalten, diese Fragmente der Theorie der sequenzunabhängigen Amplifikation nach aber höchstwahrscheinlich unterschiedlicher Natur sind, bedarf es vor deren Sequenzierung eines Klonierungsschrittes, um die DNA-Fragmente zu vereinzeln und zu vermehren (*shotgun*-Klonierung). Zu diesem Zweck wurden die aufgetrennten PCR-Produkte unter Zuhilfenahme des *Wizard® CV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel gelöst und deren Konzentration mittels einem *NanoDrop ND-1000*-Spectrophotometer (PEQLAB) und der ND-1000 Software, Version 3.8.1 (PEQLAB) ermittelt. Die aufgereinigten PCR-Produkte dienten als Ausgangsprodukt für die Klonierung.

Die Klonierung wurde mit dem *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen) und dem *pCR®4-TOPO®Vector* unter Verwendung von *5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)*-Zellen (New England Biolabs) durchgeführt. Die Ligation der Insertionen in den Vektor erfolgte nach Herstellerangaben in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen mit einer Inkubationszeit von 5 Minuten, wobei annäherungsweise auf ein 3:1-Verhältnis von PCR-Produkt zum Vektor geachtet wurde. Die Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli*-Bakterien erfolgte auf Eis. Sobald die Bakteriensuspension auf Eis geschmolzen war, wurden 2 µl der Ligationsreaktion in das Zellröhrchen zu den Bakterien pipettiert, vorsichtig durch kurzes Schnippen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein 30 Sekunden langer Hitzeschock der Zellen bei 42°C im Wasserbad. Danach wurden die Zellröhrchen 2 Minuten auf Eis gekühlt. Unter Zugabe von je 250 µl 1 X *super optimal broth with catabolite repression*-(SOC)-Medium (New England Biolabs) wurde die Reaktion 1 Stunde bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurde von jedem Ansatz zusätzlich eine 1:2-Verdünnung unter Zugabe von SOC-Medium hergestellt und je 50 µl des unverdünnten und verdünnten Ansatzes auf vorgewärmte *lysogeny broth*-(LB)-Platten mit 50µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation der Selektivplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Die gewünschte Anzahl an

Einzelkolonien wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze aufgenommen und jeweils in ca. 5 ml flüssiges LB-Medium mit Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin angeimpft. Dieses wurde wiederum 5 – 6 Stunden oder über Nacht bei 37°C bei ca. 200 rpm in einem *C-24 Classic Benchtop Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific) inkubiert.

Die auf diese Weise vermehrten Plasmide wurden darauffolgend mit dem *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) unter Anwendung des alternativen Protokolls für größere Volumina aus je 3 ml gut durchmischem LB-Medium aufgereinigt.

Das erfolgreiche Klonieren der PCR-Produkte wurde durch PCR mit T3- und T7-Sequenzierungsprimern (Invitrogen) und Gelelektrophorese überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Ansatz mit einer 1:100-Verdünnung des aufgereinigten Plasmids angesetzt und 2 µl davon als *Template* für die PCR verwendet. Reaktionsansatz und Mastermix-Zusammensetzungen wurden bereits in IV.4. beschrieben. Die Primersequenzen und das Temperaturprotokoll sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tab. 11: Primersequenzen und Temperaturprotokoll für die Insertionskontrolle der erstellten Plasmide mittels PCR**

Primer		
T3 (0,1 µg/µl)	5' –ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA – 3'	
T7 (0,1 µg/µl)	5' –TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	
Temperaturprotokoll		
Polymeraseaktivierung	1x	3 min bei 95°C
Denaturierung		30 sec bei 95°C
Annealing	42x	30 sec bei 55°C
Extension		1 min bei 72°C
Extension	1x	5 min bei 72°C

Die PCR-Produkte wurden wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Alternativ dazu wurde in manchen Fällen eine Insertionskontrolle durch Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* (NEB) durchgeführt. Da das Plasmid zwei *EcoRI*-Restriktionsstellen unmittelbar angrenzend zur Ligationsstelle aufweist, konnte die Insertion enzymatisch aus dem Plasmid gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierzu wurde eine zusätzliche Plasmidaufreinigung mit dem *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) nach dem normalen Protokoll durchgeführt. 20 µl Plasmid wurden mit 1 µl *EcoRI* und 2 µl Reaktionspuffer 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 10 µl

geschnittenes und 10 µl ungeschnittenes Plasmid wurden verglichen. Alle aufgereinigten Plasmide, deren Insertionen in der PCR oder der Restriktionsanalyse Banden der ursprünglichen Größe zeigten, wurden sequenziert.

### 5.3. Sequenzierung

Die extrahierten Plasmide wurden nach den Vorgaben von *Eurofins Genomics* (Ebersberg) aufbereitet (25µl Volumen, Konzentration 50-100ng/µl) und dorthin zur Auftragssequenzierung geschickt. Es kamen *ABI 3730XL*-Sequencer (Applied Biosystems), also Zyklussequenzer, die unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerase nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode arbeiten, zum Einsatz. Als Sequenzierungsprimer wurden T3 und T7 verwendet. Pro Ansatz wurden ca. zehn Klone sequenziert.

### 5.4. BLAST-Suche

Die sequenzierten Insertionen wurden nach Abzug von Primersequenzen auf dem *Webinterface* des BLAST® (<http://blast.st-vi.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) einer *nucleotide* BLAST-Suche unterzogen, um nach Übereinstimmungen mit Sequenzen in der Nukleotiddatenbank zu suchen. Als Suchalgorithmus wurde zuerst *megablast* gewählt, der am besten für den Vergleich von Sequenzen mit einer Übereinstimmungsrate von mind. 95 Prozent geeignet ist. Im Falle dass dies keine Treffer erzielte, wurden die Suchkriterien gelockert und mit *discontiguous megablast* und *blastn* weitergearbeitet.

### 5.5. Sequenzierungsergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse der BLAST-Suche erfolgt in tabellarischer Form. Die darin enthaltenen Bezeichnungen der Klone beinhalten jeweils eine Zahl, die auf die Nummer der ausgeschnittenen Gelbande hinweist, zusätzlich einen Buchstaben oder Schrägstrich mit einer weiteren Zahl. Dies soll die Anzahl der Klone derselben Bande in numerischer bzw. alphabetischer Anordnung wiedergeben. Weiterhin schließt sich mit einem Unterstrich der verwendete Sequenzierungsprimer an (T3 oder T7). Beispielsweise bedeutet 1a\_T7: erster Klon aus Gelbande 1, sequenziert mit Primer T7. Klon 3/2\_T3 bezieht sich auf den 2. Klon aus Gelbande 3, sequenziert mit Primer T3.

Die Suchanfrage (*query*) entspricht der eingesetzten oder gesuchten Sequenz. Der

Begriff „Treffer“ wird für eine gefundene Sequenz aus der Datenbank (Homologie) verwendet, die durch die BLAST-Suche ermittelt worden ist. Die Fragmentlänge bezieht sich auf die Länge der Suchanfrage bzw. des PCR-Fragments nach Abzug der endständigen Primer. Der Abgleich findet durch ein Aneinanderlagern (*alignment*) der Suchanfrage mit relevanten Sequenzen aus der Datenbank statt. Die Abdeckrate (*query coverage*) bezeichnet dabei den prozentualen Anteil der vom Treffer abgedeckten Suchanfrage und nimmt idealerweise den Wert 100 ein. Die Identität (*identity*) gibt die prozentuale Gleichheit bzw. Übereinstimmung der Gesamtheit der Basen innerhalb der Aneinanderlagerung von Suchanfrage und Treffersequenz an. Sie ist somit sowohl ein Maß für die Qualität der Sequenzierung als auch für die Korrektheit des Treffers. Je mehr die Werte für Abdeckrate und Identität von 100 % abweichen, desto weniger zuverlässig sind die Ergebnisse hinsichtlich ihres tatsächlichen Vorkommens, d. h. desto unwahrscheinlicher ist es, dass der erzielte Treffer tatsächlich in der Probe vorhanden ist.

Homologien zu EHV-1-Sequenzen waren bei der durchgeführten BLAST-Suche stets an erster Stelle der BLAST-Trefferübersicht, weshalb im Folgenden für jeden Klon nur jeweils der beste Treffer genannt wird. Es wird davon ausgegangen, dass dieser am wahrscheinlichsten die wahre Natur der eingesetzten Sequenz widerspiegelt.

Die Übersichtstabellen enthalten zusätzlich Informationen über die Qualität der Sequenzierung jedes einzelnen klonierten PCR-Fragments. Dazu wurde der Name des Klons mit einer von drei Farben hinterlegt (Tabelle 12). Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der Angaben zur Durchschnittsqualität (*average quality*-Werte) im Qualitätsbericht, der als Teil der Sequenzierungsdaten durch die Firma Eurofins ermittelt worden war. In diesem Bericht wurde jeder Base ein Qualitätswert zugewiesen, der in einem von vier Bereichen liegen konnte. Die einzelnen Qualitätswerte wurden addiert und durch die Anzahl aller Basen geteilt. Lag der resultierende Wert unter 19, wurde die Sequenzierungsqualität als schlecht beurteilt, ein Wert zwischen 20 – 25 wurde als gute, ein Wert über 26 als sehr gute Qualität eingestuft. Die Grenzen der drei Qualitätsbereiche wurden nach eigener Beurteilung des Elektropherogramms gewählt, da der Qualitätsbericht keine durchschnittliche Gesamtqualität bezogen auf das PCR-Fragment enthielt. Je besser die Sequenzierungsqualität, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine sequenzierte Base der tatsächlich an dieser Stelle vorkommenden Base

entspricht.

**Tab. 12: Qualitäts-Score für die Sequenzierung der Klone**

<b><math>\leq 19</math></b>	<b>schlecht</b>
<b>20 – 25</b>	<b>gut</b>
<b><math>&gt;26</math></b>	<b>sehr gut</b>

Jeder Sequenzierung wurde ein Qualitätsbereich zugewiesen, der die durchschnittliche Gesamtqualität des jeweiligen sequenzierten PCR-Fragments widerspiegeln soll.

## V. ERGEBNISSE

Die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in drei Teile. Zuerst findet die Darstellung von Versuchen zur Wirksamkeit der DNase auf DNA in Ab- und Anwesenheit von Gewebe und zum Schutz der viralen DNA vor DNase-Abbau durch das Viruskapsid statt. Im zweiten Teil folgt eine Übersicht über die Ergebnisse der SISPA und *random*-PCR geordnet nach Probenmaterial. Daran schließt sich eine Gegenüberstellung beider Methoden auf Basis der erzielten Ergebnisse an.

### 1. Wirksamkeit der DNase

Der DNase-Behandlung kam im Rahmen der relativen Virusanreicherung im Probenmaterial eine zentrale Bedeutung zu (vgl. IV.2.). Aus vorangegangenen Versuchen mit anderen DNasen erwies sich die *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) als das wirksamste Enzym. Um deren hydrolytischen Effekt auf DNA quantitativ bestätigen zu können, wurde der Einfluss auf reine DNA, die aus EHV-1-haltigem Zellkulturüberstand gewonnen worden war, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Gewebebestandteilen mittels *real time*-PCR gemessen.

#### 1.1. Effekt der DNase auf EHV-1-DNA aus Zellkulturüberstand

Aufgereinigte EHV-1-DNA wurde mit 5 bzw. 10 µl DNase verdaut. Zum Vergleich wurde einerseits die gleiche Menge DNA unbehandelt (Positivkontrolle) geprüft und andererseits ein Ansatz getestet, bei dem die DNase zur Untersuchung inkubationsassoziiierter Effekte durch Wasser ersetzt wurde. Der Enzymverdau wurde im Doppelansatz durchgeführt und die resultierenden Proben als Duplikat in der PCR gemessen (Tabelle 13).

**Tab. 13: Abbau von EHV-1-DNA durch *Turbo<sup>TM</sup>DNase***

	Positivkontrolle	H <sub>2</sub> O	5 µl DNase	10 µl DNase
<b>Einzelwerte</b>	17,30	16,87	-	-
	16,90	16,83	37,43	-
	17,14	17,23	37,38	-
	17,28	17,42	-	33,92

Unbehandelte (Positivkontrolle) und ohne Enzym inkubierte Proben (H<sub>2</sub>O) wurden mit DNase-behandelten Proben mittels *real time*-PCR verglichen. Wo in der Tabelle keine Werte angeführt sind, war keine DNA nachweisbar.

Verglichen mit der Positivkontrolle hatte die reine Temperaturbehandlung, d. h. der Wasseransatz, keine Auswirkung auf den mittels PCR nachweisbaren DNA-Gehalt der Probe. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von DNase den erwarteten Abbau von DNA. Dabei waren bereits 5 µl bzw. 10 Einheiten des Enzyms ausreichend, um im Mittel eine Reduktion von 18 Zyklen zu erzielen, was etwa einer 260000-fachen Reduktion (angenommen 1 Ct = Faktor 2) an DNA-Menge entspricht. 10 µl bzw. 20 Einheiten des Enzyms bewirkten keine weitere Reduktion. Somit wurden 5 µl Enzym als Standardkonzentration für den DNase-Verdau im SISPA- bzw. *random*-PCR-Protokoll gewählt.

### 1.2. Einfluss von Gewebe auf den Effekt der DNase auf EHV-1-DNA

Da die Bedingungen für den DNase-Verdau aus Versuch V.1.1. nur für zellarme Probenmaterialien zutreffen, wurde Gewebematerial mit EHV-1-DNA gemischt bzw. gespikt, um die Verhältnisse für die Enzymbehandlung bei Organproben nachzuahmen. Dies diente der Abklärung potentieller inhibitorischer Effekte. Die gespikten Doppelansätze, als auch die aufgereinigte, zum Spiken verwendete DNA wurden zu diesem Zweck jeweils einmal ohne und einmal mit DNase inkubiert und daraus isolierte DNA in der PCR als Duplikat getestet (Tabelle 14).

**Tab. 14: Einfluss von Gewebe auf den Abbau von EHV-1-DNA mit *Turbo*<sup>TM</sup>DNase (Ambion)**

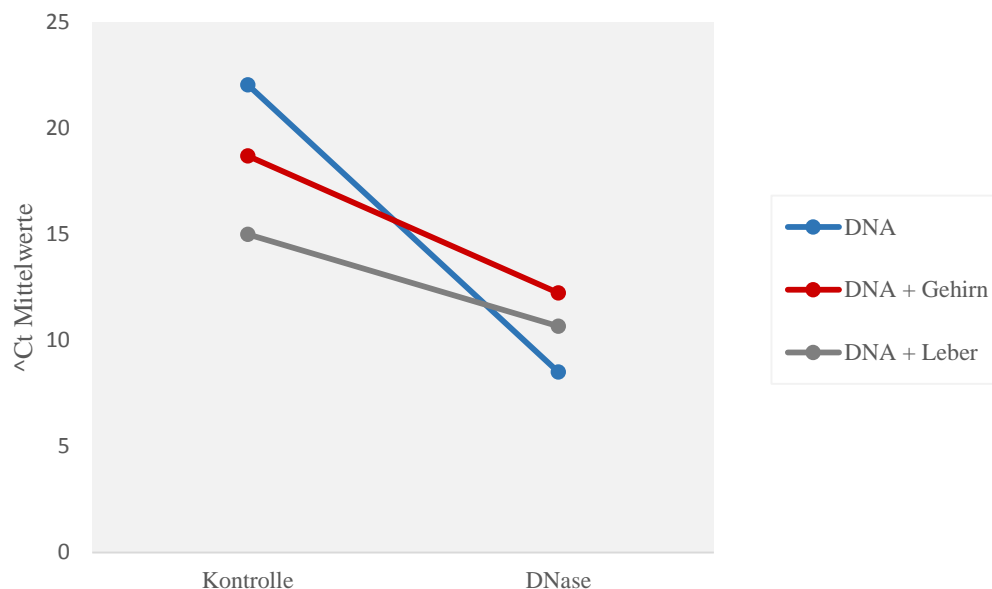
	Positiv-kontrolle DNA	DNase DNA	Positiv-kontrolle DNA + Gehirn	DNase DNA + Gehirn	Positiv-kontrolle DNA + Leber	DNase DNA + Leber
<b>Einzel- werte</b>	17,96	32,07	20,80	27,72	24,47	29,58
	17,93	31,95	20,62	27,96	24,45	29,74
	17,89	31,02	21,89	27,74	25,45	29,11
	18,06	30,94	21,93	27,67	25,65	28,91
<b>Mittel- wert</b>	<b>17,96</b>	<b>31,50</b>	<b>21,31</b>	<b>27,77</b>	<b>25,01</b>	<b>29,34</b>

**Unbehandelte DNA ohne Gewebe (Positivkontrolle DNA) und mit Enzym inkubierte Proben (DNase DNA) wurden verglichen mit unbehandelter DNA und Gewebe (Positivkontrolle DNA + Gehirn/ Leber) und mit Enzym inkubierten Proben, die mit Gewebe gespikt waren (DNase DNA + Gehirn/ Leber).**

Die DNase-Behandlung der reinen DNA führte zu einem Anstieg von ungefähr 13 Cts, was etwa einer 8000-fachen Reduktion der nachweisbaren viralen DNA entspricht. Im Gegensatz dazu erfolgte im DNase-Ansatz mit Gehirn- bzw. Lebergewebe verglichen mit der jeweils unverdauten Probe nur ein Anstieg um 7

bzw. 4 Cts, was einer 128-fachen bzw. 16-fachen Reduktion gleichkommt. Es wurde in Anwesenheit von Gewebe somit deutlich weniger EHV-1-DNA verdaut, als dies im Vergleichsansatz mit reiner DNA ohne Gewebezugabe der Fall war. Weiterhin war die Ausgangsmenge an EHV-1-DNA bei den gespickten Proben verglichen zu dem jeweiligen Kontrollansatz geringer (3 Cts bei Gehirn, 7 Cts bei Leber oder 8 bzw. 128-fach geringere Menge), obwohl bei allen Ansätzen die gleiche Menge an DNA-haltigem Präparationsansatz eingesetzt wurde.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse des Experiments für die drei verschiedenen Probenarten dargestellt. Zur besseren Visualisierung wurden aus den angegebenen Mittelwerten delta-Ct-Werte ( $\Delta Ct; = 40 - Ct$ ) gebildet.



**Abb. 13: Abbau von EHV-1-DNA durch die *Turbo™DNase* (Ambion) in Ab- und Anwesenheit von Gewebe**

Reine DNA (blau) wurde unbehandelt (Kontrolle) und mit Enzym behandelt (DNase) mit den entsprechenden Ansätzen von durch Gehirn- (rot) bzw. Lebermaterial (grau) gespickten DNA-Proben verglichen.

## 2. Protektion viraler DNA durch Kapsid und Hülle vor enzymatischem Abbau

Es sollte geklärt werden, ob durch das Viruskapsid und ggf. die Virushülle eine protektive Wirkung auf virale DNA gegen enzymatische Spaltung durch die DNase ausgeht. Diese Hypothese stellt eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit der DNase zum Zweck der relativen Virusanreicherung im SISPA- und *random-*



PCR-Protokoll durch selektiven Abbau zellulärer und bakterieller DNA dar.

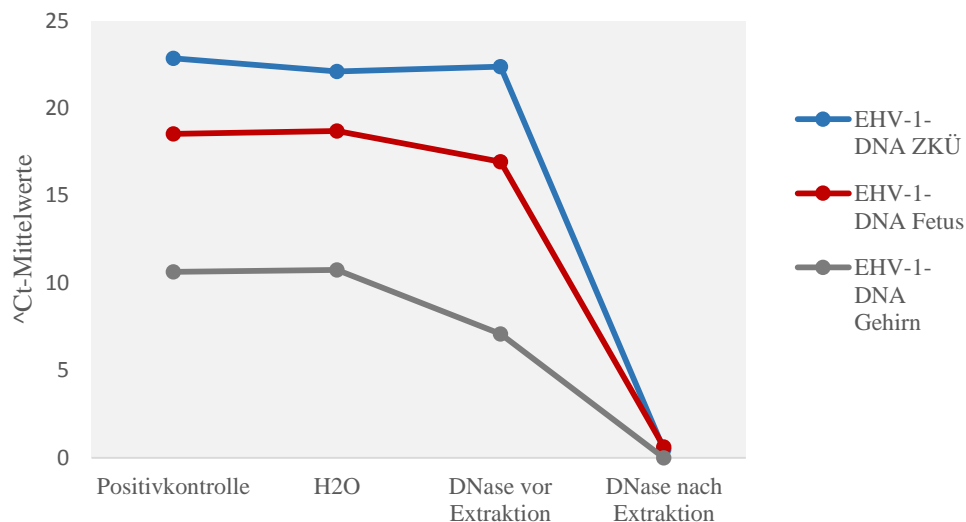
Aus diesem Grund wurde virale DNA von EHV-1 aus unterschiedlichen Probenmaterialien einem DNase-Verdau vor und nach Extraktion der Nukleinsäuren ausgesetzt (Tabelle 15).

**Tab. 15: Abbau von EHV-1-DNA vor und nach Extraktion der Nukleinsäuren durch *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion)**

	Positiv-kontrolle	H <sub>2</sub> O	DNase vor Extraktion	DNase nach Extraktion
<b><u>ZKÜ</u> Einzelwerte</b>	17,13	18,08	17,62	-
	16,99	17,91	17,60	-
	17,47	17,62	17,72	38,11
	17,02	17,97	17,58	-
	<b>17,15</b>	<b>17,90</b>	<b>17,63</b>	
<b><u>Gehirn</u> Einzelwerte</b>	29,07	29,85	32,20	-
	29,49	29,45	32,66	-
	29,38	28,89	33,40	-
	29,49	28,82	33,42	-
	<b>29,36</b>	<b>29,25</b>	<b>32,92</b>	
<b><u>Leber</u> Einzelwerte</b>	21,51	21,72	23,10	-
	21,72	21,65	23,09	-
	21,34	21,04	22,94	-
	21,29	20,84	23,12	37,55
	<b>21,47</b>	<b>21,31</b>	<b>23,06</b>	

Unbehandelte DNA (Positivkontrolle) und ohne Enzym inkubierte Proben (H<sub>2</sub>O) wurden mit einer DNase-Behandlung verglichen, die vor bzw. nach Extraktion der Nukleinsäuren stattfand (DNase vor bzw. nach Extraktion).

Die Enzymbehandlung bewirkte nach der Extraktion der Nukleinsäuren eine deutliche Reduktion der viralen DNA. Vor der Extraktion blieb die virale DNA trotz Enzymzugabe weitgehend stabil bzw. wurde nur geringfügig abgebaut. Bezogen auf einen Ct-Wert von 40 als Nachweisgrenze der PCR war der Anstieg beim ZKÜ mit mind. 22 Cts im Vergleich zur Positivkontrolle am deutlichsten. Dieser entspricht einer mind. 4-millionenfachen Reduktion der messbaren DNA. Bei Gehirn und Leber wurde der DNA-Gehalt durch die DNase-Behandlung nach Extraktion ca. 1000- bzw. 500000-fach verringert (10 bzw. 19 Cts). Vor der Extraktion durchgeführt bewirkte der DNase-Verdau eine Verringerung viraler DNA um das 16- bzw. 4-Fache (4 bzw. 2 Cts) für Gehirn bzw. Leber (Abbildung 14).



**Abb. 14: Abbau von EHV-1-DNA durch *Turbo™DNase* (Ambion) vor und nach Extraktion der Nukleinsäuren**

Unbehandelte DNA (Positivkontrolle) und ohne Enzym inkubierte Proben (H2O) wurden verglichen mit einer DNase-Behandlung, die jeweils vor bzw. nach Extraktion der Nukleinsäuren stattfand (DNase vor bzw. nach Extraktion).

### 3. Verlust viraler DNA bei Durchführung des SISPA- bzw. *random-PCR-Protokolls*

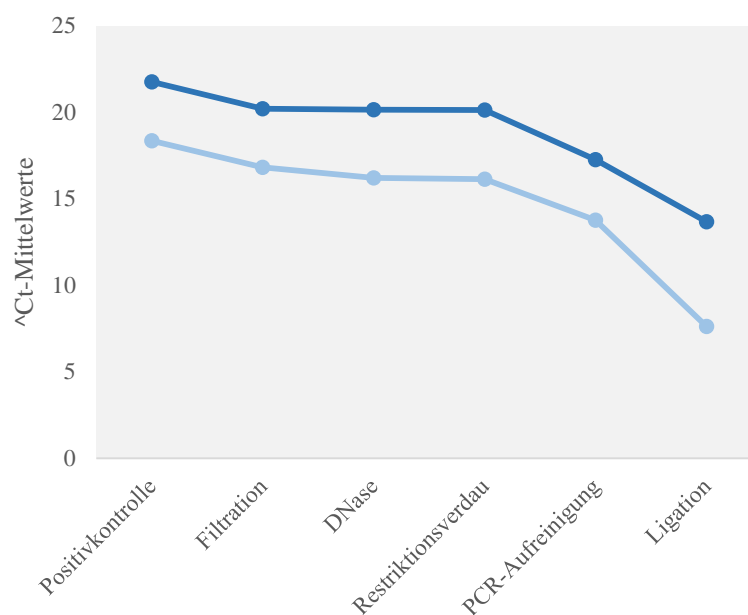
Die einzelnen Behandlungsschritte, die vor der PCR im SISPA- bzw. *random-PCR-Protokoll* stattfanden, dienten dem Zweck der relativen Virusanreicherung. Trotzdem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese Prozesse auch zu einem gewissen Verlust der absoluten Menge an viraler Nukleinsäure führten. Aus diesem Grund wurde der EHV-1-DNA-Gehalt nach jedem Behandlungsschritt des Protokolls (Filtration, DNase- und Restriktionsenzymverdau, Aufreinigung und Ligation) am Beispiel von virushaltigem ZKÜ mittels *real time-PCR* überwacht (Tabelle 16). Dies erfolgte jeweils für die unverdünnten und 1:10-verdünnten Proben, um PCR-bedingte inhibitorische Effekte auszuschließen.

Über den Verlauf der Probenbehandlung wird ein gradueller Verlust an EHV-1-DNA ersichtlich, der in einer ca. 250-fachen bzw. 2000-fachen Reduktion (8 Cts unverdünnt, 11 Cts verdünnt von Positivkontrolle bis Ligation) resultierte. Am deutlichsten stiegen die Ct-Werte durch den Vorgang der Filtration, der Aufreinigung der Probe und durch den Ligationsschritt. Abbildung 15 zeigt den gemessenen DNA-Verlust grafisch mithilfe des  $\Delta$ Ct-Mittelwertes.

**Tab. 16:** Gehalt an EHV-1-DNA nach Behandlungsschritten im SISPA- bzw. *random*-PCR-Protokoll

		PO	Filtration	DNase	RV	PCR-Aufr.	Ligation
EHV-1-DNA	Einzelwerte	18,36	19,85	19,79	19,91	22,74	25,94
		18,14	19,75	19,9	19,82	22,74	26,71
	Mittelwert	<b>18,25</b>	<b>19,80</b>	<b>19,85</b>	<b>19,87</b>	<b>22,74</b>	<b>26,33</b>
EHV-1-DNA 1:10	Einzelwerte	21,84	23,08	23,68	23,9	26,15	32,46
		21,44	23,29	23,9	23,82	26,32	32,29
	Mittelwert	<b>21,64</b>	<b>23,19</b>	<b>23,79</b>	<b>23,86</b>	<b>26,24</b>	<b>32,38</b>

Bestimmung des per *real time*-PCR messbaren Gehalts an EHV-1-DNA basierend auf unverdünntem und 1:10-verdünntem Eluat aus EHV-1-haltigem Zellkulturüberstand (PO, Positivkontrolle). Weitere Messungen erfolgten nach Filtration, Verdau durch DNase (DNase) und Restriktionsenzym (RV), Aufreinigung der Probe (PCR-Aufr.) und nur für das SISPA-Protokoll nach Ligation des Adaptermoleküls (Ligation).

**Abb. 15:** Gehalt an EHV-1-DNA nach Behandlungsschritten im SISPA- bzw. *random*-PCR-Protokoll

Es erfolgte eine Messung des Gehalts an EHV-1-DNA in unverdünntem (obere Linie) und 1:10-verdünntem Eluat (untere Linie) aus EHV-1-haltigem Zellkulturüberstand. Der Gehalt an EHV-1-DNA wurde nach reiner Extraktion (Positivkontrolle), Filtration, DNase- und Restriktionsverdau, Aufreinigung der Probe (PCR-Aufreinigung) und nach Ligation im Falle des SISPA-Protokolls per *real time*-PCR ermittelt.

## 4. Ergebnisse des SISPA-bzw. *random*-PCR-Protokolls

### 4.1. Ausgangsmaterial

Die SISPA und die *random*-PCR wurden mit denselben Probenmaterialien durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast im Ausgangsmaterial erfolgte vorher eine Messung durch *real time*-PCR; die Ct-Werte dazu sind in Tabelle 17 angegeben.

**Tab. 17: Ct-Werte der EHV-1-haltigen Ausgangsmaterialien für SISPA und *random*-PCR**

	ZKÜ	Zellen	Liquor	Leber	Gehirn
Ct-Wert	19,97	19,97	34,06	19,68	24, 04

### 4.2. Darstellung der Sequenzierungsergebnisse

Für jeden Klon wurde jeweils der beste Treffer der BLAST-Suche gelistet. Dieser wurde gemäß den Voreinstellungen der Trefferliste von BLAST für die Suche auf Nukleotidebene ausgewählt. Sowohl der Virusstamm zur Infektion der Zellkultur als auch die Stämme der klinischen Proben (außer Liquor) waren vor Durchführung der beiden Diagnostikmethoden in ihrer Sequenz unbekannt. Die besten Treffer der BLAST-Suche beinhalteten wiederholt Homologien mit den in Tabelle 18 gelisteten drei Stämmen des Equinen Herpesvirus-1. Die Unterschiede untereinander bezüglich Identität und Abdeckrate waren allenfalls sehr gering. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden deswegen die Übereinstimmungen, die einen der drei Stämme beinhalteten, in den folgenden Listen lediglich als „EHV-1“ benannt. Alle weiteren Homologien wurden unter Nennung der in der BLAST-Suche erschienenen vollständigen Bezeichnung aufgelistet.

**Tab. 18: Auflistung von EHV-1-Stämmen, die in den Übersichtslisten der Sequenzierungsergebnisse als „EHV-1“ bezeichnet werden**

Virusstamm	Zugangsnummer	Version
<i>Equid herpesvirus 1 DNA, complete genome, isolate: 5586</i>	AP012321	AP012321.1
<i>Equine herpesvirus 1 strain V592, complete genome</i>	AY464052	AY464052.1
<i>Equine herpesvirus 1 strain Ab4, complete genome</i>	AY665713	AY665713.1

Aufzeichnungen über den jeweiligen Stamm aus *GenBank* sind unter der angegebenen Zugangsnummer zu finden und beziehen sich auf die gelistete Version.

Die Darstellung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt in den nächsten Abschnitten unter Berücksichtigung der verschiedenen Probenmaterialien und beinhaltet Übersichtstabellen mit allen sequenzierten Klonen. Die relevanten Tabellen befinden sich in Kapitel V, alle weiteren Tabellen sowie die Sequenzen der klonierten Fragmente mit EHV-1-Homologien (Tabellen 43 und 44) sind dem Anhang (X.2.) zu entnehmen. Weiterhin findet ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden unter Auflistung von Genomabschnitten und Fragmentlängen der Klone mit Sequenzhomologien zum EHV-1-Genom statt.

### **4.3. Ergebnisse der SISPA**

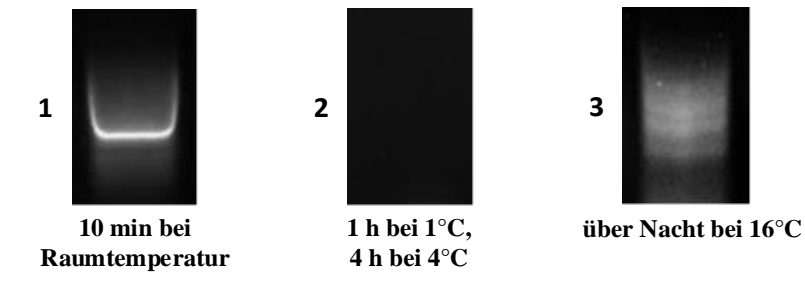
#### **4.3.1. Vorversuche zur Ligation**

Die Ligation eines Adapters an die *Template*-DNA ist ein entscheidender Schritt für die nachfolgende PCR, da nur DNA mit endständigen Adaptermolekülen amplifiziert wird. Die Effizienz des Ligationsschrittes und somit der sich anschließenden PCR unterlag temperatur- und konzentrationsabhängigen Schwankungen. Abbildung 16 stellt die entstandenen PCR-Produkte nach Anwendung verschiedener Temperaturprotokolle und eines Vorinkubationsschritts für die Ligation dar. Als *Template* diente restriktionsenzymverdaute und aufgereinigte DNA aus EHV-1-haltigem ZKÜ. Das vom Hersteller für kohäsive Enden vorgegebene Protokoll von 10 Minuten bei Raumtemperatur erzielte lediglich eine einzige Bande (Abbildung 16.1). Um eine höhere Ausbeute an PCR-Produkten unterschiedlicher Länge zu erreichen, wurden alternative Temperaturprotokolle getestet. Dabei führte die Inkubation von 1 h bei 1°C, gefolgt von 4 h bei 4°C zu keinen darstellbaren Produkten (Abbildung 16.2). Im Gegensatz dazu konnten durch die Ligation bei 16°C über Nacht zwei bis drei kaum voneinander abgrenzbare, unklare Banden erzielt werden (Abbildung 16.3), die sich nach Exzision aus dem Gel, Aufreinigung und erneuter PCR mit den zuvor verwendeten Primern als spezifische, klare Banden darstellen ließen.

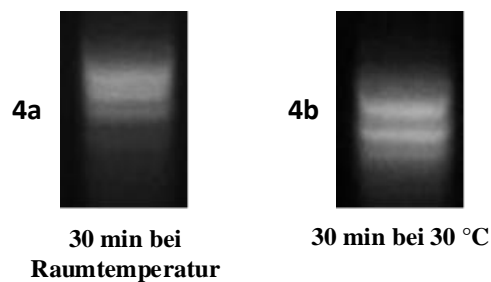
Um eine mögliche Zusammenlagerung der Adaptermoleküle, die die Effizienz der Ligation beeinträchtigen würde und durch Aufbewahrung im Kühlschrank (4°C) herbeigeführt werden könnte, zu untersuchen, wurde der Adapter einerseits bei Raumtemperatur, andererseits bei 30°C 30 Minuten lang vorinkubiert, um eine mögliche Zusammenlagerung zu lösen. Da für das doppelsträngige

Adaptermolekül Ncsp eine Schmelztemperatur von 32°C ermittelt worden war, wurde diese Temperatur zur Bewahrung der Integrität nicht überschritten. So entstanden durch Vorinkubation bei Raumtemperatur bzw. bei 30°C und nachfolgender Ligation bei 16°C über Nacht 2 – 3 Banden, die beim 30°C-Ansatz deutlicher und klar abgrenzbar erschienen (Abbildung 16.4a und b). Die Vorinkubation bei 30°C wurde in der Folge standardmäßig durchgeführt.

Ligationsreaktion:



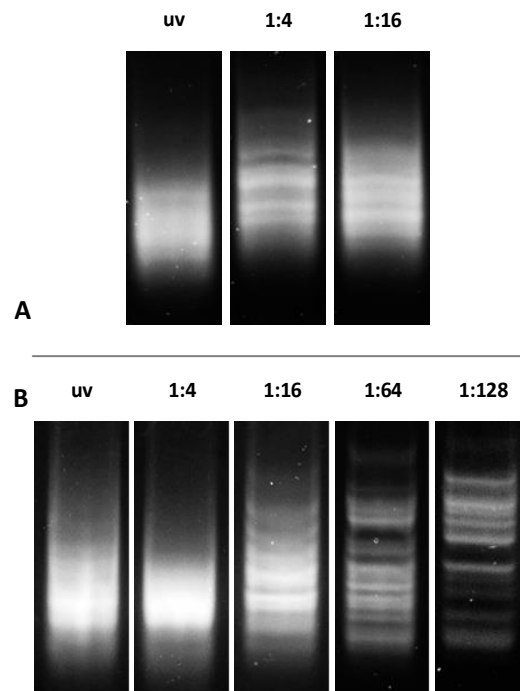
Vorinkubation:



**Abb. 16: PCR-Produkte nach Ligation mit verschiedenen Temperaturprotokollen (1-3) und Vorinkubation des Adapters Ncsp (4)**

Verschiedene Temperaturprotokolle beim Ligationsschritt (1 – 3) wurden nach PCR und Gelelektrophorese miteinander verglichen. Zusätzlich wurde eine Vorinkubation des Adapters (4) durchgeführt, gefolgt von einer Ligation bei 16°C über Nacht.

Weiterhin wurden log-4-Verdünnungsstufen von Adapter bzw. *Template*-DNA angefertigt. Abbildung 17 zeigt die entstandenen PCR-Produkte nach Vorinkubation und Ligation mit unterschiedlichen Konzentrationsschemata von Adapter (Abbildung 17A) bzw. DNA (Abbildung 17B) bei 16°C über Nacht. Als *Template* diente restriktionsenzymverdaute und aufgereinigte DNA aus EHV-1-haltigem Liquor.



**Abb. 17: PCR-Produkte nach Ligation mit verschiedenen log-4-Verdünnungsstufen von Adapter (A) bzw. *Template*-DNA (B)**

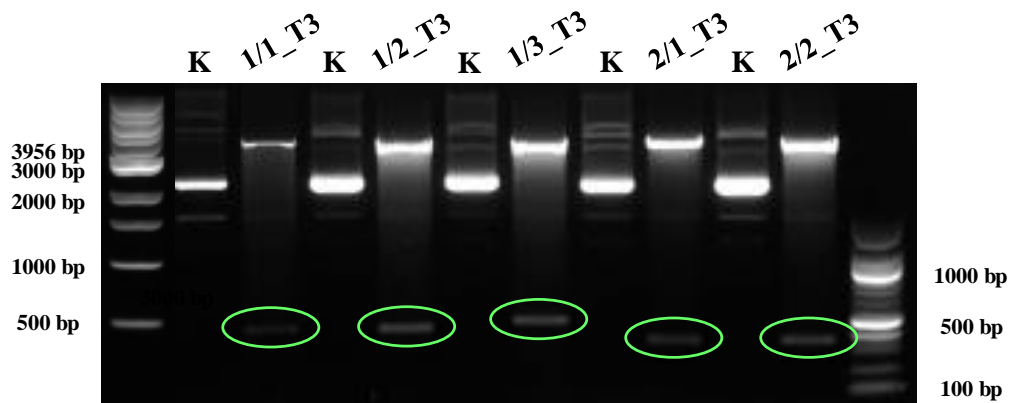
Nach Vorinkubation für 30 Minuten bei 30°C wurden unverdünnte (uv) und log-4-verdünnte Ansätze von Adapter (A) bzw. DNA (B) aus EHV-1-haltigem Liquor bei 16°C über Nacht ligiert.

Die Verdünnung des Adapters, die in einer relativen Erhöhung der *Template*-DNA resultierte, erzielte einige unklare Banden (Abbildung 17A). Nach serieller Verdünnung der *Template*-DNA und Ligation entstanden PCR-Produkte, die sich als klare Gelbanden darstellten (Abbildung 17B). Das optimale Verhältnis von DNA zu Adapter ließ sich nicht pauschal bestimmen. Es schien vom Probenmaterial und dessen jeweiligem Gehalt an viraler DNA abzuhängen. Daher wurden für die Ligation ergebnisabhängig Verdünnungsstufen des *Templates* und des Adapters angefertigt, verglichen und dann mit den Banden aus dem besten Ansatz weitergearbeitet.

#### 4.3.2. Zellkulturüberstand

Die SISPA wurde zunächst mit ZKÜ (Ct 19,97) durchgeführt. Dieser wies den geringsten Zellgehalt unter den verwendeten Materialien auf und schien somit hinsichtlich der selektiven Anreicherung von Virus am erfolgversprechendsten. Nach Virusanreicherung durch physikalische und chemische Methoden, Ligation und PCR mit NBam24 als Primer erfolgte die Darstellung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Banden ab einer Größe von ca. 250 bp wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert. Gewonnene Bakterien-Klone wurden

mittels Restriktionsverdau der daraus gewonnenen Plasmide auf das Vorhandensein einer entsprechenden Insertion überprüft (Abbildung 18).



**Abb. 18: Kontrolle von Plasmiden auf die korrekte Größe der inserierten PCR-Produkte**

Restriktionsgeschnittene Plasmide (1/1\_T3 usw.) wurden auf das Vorhandensein von klonierten Insertionen (grün markiert) geprüft und vergleichend zum jeweils unbehandelten Plasmid (K) aufgetrennt.

Plasmide, deren inserierte DNA eine Längenübereinstimmung mit dem ursprünglichen PCR-Amplifikat aufwies, wurden sequenziert und durch BLAST auf Homologien mit Abschnitten des EHV-1-Genoms überprüft. Die BLAST-Suche mit insgesamt zwölf Klonen führte zu sieben Übereinstimmungen (Tabelle 19).

**Tab. 19: Ergebnisse der SISPA bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem ZKÜ**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
1_T3	EHV-1	92	92	252
2_T3	EHV-1	95	100	380
3_T3	EHV-1	100	100	252
1/1_T3	EHV-1	100	100	374
1/2_T3	EHV-1	78	100	357
1/3_T3	EHV-1	98	100	394
2/1_T3	Cloning vector*	89	100	415
2/2_T3	EHV-1	86	34	405
2/3_T3	Cloning vector*	92	70	321
3/1_T3	Cloning vector*	99	98	248
3/2_T3	Cloning vector*	95	99	302
3/3_T3	Cloning vector*	99	100	281

\*Cloning vector pCRm-luc2-PHLEO, complete sequence

Die klonierte und sequenzierte DNA wurde entweder dem Genom des EHV-1 oder der Sequenz des *Cloning vector pCRm-luc2-PHLEO, complete sequence*,



zugeordnet. Ein Vergleich des Plasmids *pCRm-luc2-PHLEO* mit dem verwendeten Kloniervektor *pCR®4-TOPO* zeigte starke Sequenzhomologien.

#### 4.3.3. Zellsuspension

Als nächstes wurde das SISPA-Protokoll für die EHV-1-haltige Zellsuspension (Ct 19,97) durchgeführt. Von den insgesamt 21 weiteruntersuchten Klonen wiesen 14 eine Übereinstimmung mit dem EHV-1-Genom auf. Es wurden zwei verschiedene Sequenzierungsprimer verwendet (Tabelle 20).

**Tab. 20: Ergebnisse der SISPA bei der Untersuchung von EHV-1 infizierten Zellen unter Verwendung der Sequenzierungsprimer T3 (A) und T7 (B)**

##### A: T3

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
1/1_T3	EHV-1	91	92	365
1/2_T3	EHV-1	98	88	381
2/1_T3	<i>Cloning vector*</i>	96	97	315
2/2_T3	<i>Cloning vector*</i>	92	98	311
3/1_T3	EHV-1	87	85	304
3/2_T3	EHV-1	84	86	381
4/1_T3	<i>Cloning vector*</i>	98	96	297
4/2_T3	<i>Cloning vector*</i>	98	100	297
5/1_T3	<i>Cloning vector*</i>	98	98	373
5/2_T3	<i>Cloning vector*</i>	93	91	375

*\*Cloning vector pCRm-luc2-PHLEO, complete sequence*

##### B: T7

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
1/1_T7	EHV-1	100	94	365
1/2_T7	EHV-1	96	77	227
1a_T7	EHV-1	100	100	339
1b_T7	EHV-1	98	100	366
2a_T7	EHV-1	97	93	246
2b_T7	EHV-1	98	100	241
3_T7	EHV-1	99	100	362
4_T7	<i>Homo sapiens genomic DNA, chromosome 18 clone:RP11-838N2, complete sequence</i>	100	100	272
5_T7	EHV-1*	100	100	342
6_T7	EHV-1	97	100	233
7_T7	EHV-1	100	100	266

*\* Equine herpesvirus type 1 host range factor gene, Us10 protein gene, gene 67 and gene 68*

Die Sequenzierung wurde sowohl mit T3- als auch mit T7-Primern durchgeführt.

Sequenzierungsprimer werden generell zur Initiierung der Sequenzierungsreaktion benötigt. Die *priming sites* von T3 und T7 befinden sich auf dem jeweils komplementären Strang des Vektors und auf den gegenüberliegenden Seiten der Insertionsstelle (vgl. Anhang, Abbildung 26). Durch sie erfolgt die Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts aus entgegengesetzten Richtungen. Bei der Sequenzierung unter Verwendung von T3-Primern (Tabelle 20A) konnten vier von insgesamt zehn *Inserts* dem EHV-1-Genom zugeordnet werden, bei den übrigen sechs Sequenzen wurden Übereinstimmungen mit *Cloning vector pCRm-luc2-PHLEO, complete sequence*, erhalten.

Eine weitere Sequenzierung von elf Klonen mit dem T7-Primer führte zu zehn Fragmenten, die Übereinstimmungen mit EHV-1 aufwiesen (Tabelle 20B). Für eine Insertion konnten Homologien zu menschlicher chromosomaler DNA gefunden werden.

Nachfolgende Sequenzierungen wurden aufgrund der höheren Homologierate durch Verwendung des T7-Primers mit diesem ausgeführt.

#### **4.3.4. Liquor**

Der verwendete Liquor (Ct 34,06) enthielt im Vergleich zu den anderen Probenmaterialien am wenigsten DNA. Das Gehirngewebe wies 1000-fach und der verwendete ZKÜ, Zellen und Lebergewebe mind. 16000-fach mehr Virus auf. Die BLAST-Suche mit neun Klonen aus EHV-1-haltigem Liquor erzielte keine Übereinstimmungen zum Genom von EHV-1 (vgl. Anhang, Tabelle 40).

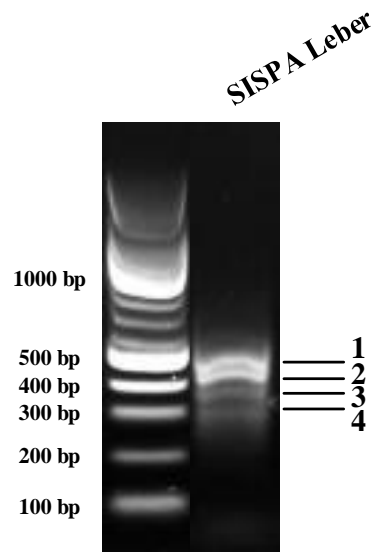
#### **4.3.5. Gewebe**

Gewebematerial stellte aufgrund der natürlicherweise vorkommenden abundanten Menge an zellulärer Nukleinsäure die größte Herausforderung für die relative Anreicherung der viralen DNA dar und somit auch für den Erfolg der Methodik an sich.

##### **4.3.5.1. Lebergewebe**

Der ermittelte Ct-Wert lag bei 19,68. Dies entsprach dem DNA-Gehalt von ZKÜ und Zellen. Die Probe enthielt ca. 16-fach bzw. 16000-fach mehr messbare DNA als Gehirn bzw. Liquor.

Nach Ligation, PCR und Gelelektrophorese wurden die vier entstandenen Banden im Bereich von 300 – 500 bp getrennt ausgeschnitten und nach Lösung aus dem Gel als *Template* für die Klonierung verwendet (Abbildung 19).



**Abb. 19: PCR-Produkte, die im Rahmen der SISPA aus dem Probenmaterial Leber gewonnen wurden**

Sechs von insgesamt sieben sequenzierten DNA-Fragmenten zeigten Homologien zu Abschnitten des Genoms von EHV-1. Ein Klon erzielte Übereinstimmungen mit menschlicher chromosomaler DNA (Tabelle 21).

**Tab. 21: Ergebnisse der SISPA bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltender Leber**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeckrate (%)	Länge (bp)
1_1_T7	EHV-1	100	100	424
1_2_T7	EHV-1	99	100	460
2_1_T7	EHV-1	100	100	391
2_2_T7	EHV-1	99	100	391
3_1_T7	EHV-1	99	100	350
3_2_T7	EHV-1	100	100	313
4_1_T7	<i>Homo sapiens chromosome, clone RP11-170D6, complete sequence</i>	75	37	281

#### 4.3.5.2. Gehirngewebe

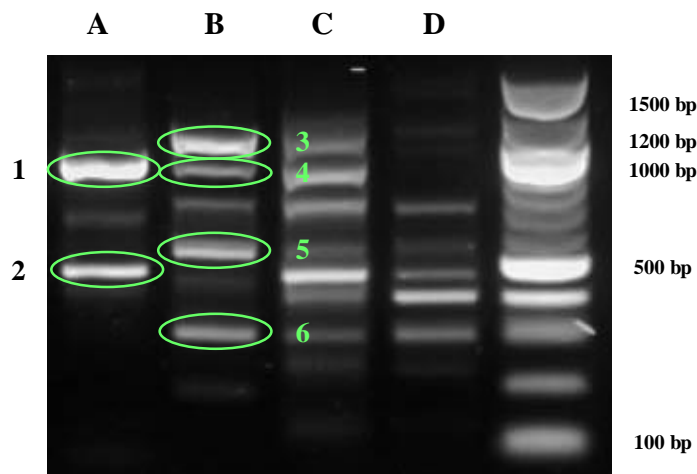
Das Gehirngewebe wies einen Ct-Wert von 24,04 auf. Es war darin somit ca. 16-fach weniger DNA als in ZKÜ, Zellen und Lebergewebe, aber ca. 1000-fach mehr DNA als im Liquor enthalten.

Trotz der Sequenzierung und BLAST-Analyse von 38 Klonen konnten keine Übereinstimmungen zu Abschnitten des EHV-1-Genoms erzielt werden (vgl. Anhang, Tabelle 41).

#### 4.4. Ergebnisse der *random*-PCR

##### 4.4.1. Zellkulturüberstand

DNA aus EHV-1-haltigem ZKÜ wurde unterschiedlich aufbereitet: i) nur DNase-Verdau, ii) DNase-Verdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente, iii) DNase- und Restriktionsenzymverdau und iv) DNase- und Restriktionsenzymverdau und anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente. Danach erfolgte die Amplifikation mittels *random*-Primer. Nach Gelelektrophorese der PCR-Produkte konnten deutliche Unterschiede in den Bandenmustern der vier Ansätze beobachtet werden (Abbildung 20). Es erfolgte die DNA-Extraktion der Banden aus den Ansätzen i) und ii), da eine möglichst einfache Durchführung der Methode erklärtes Ziel dieser Arbeit war.

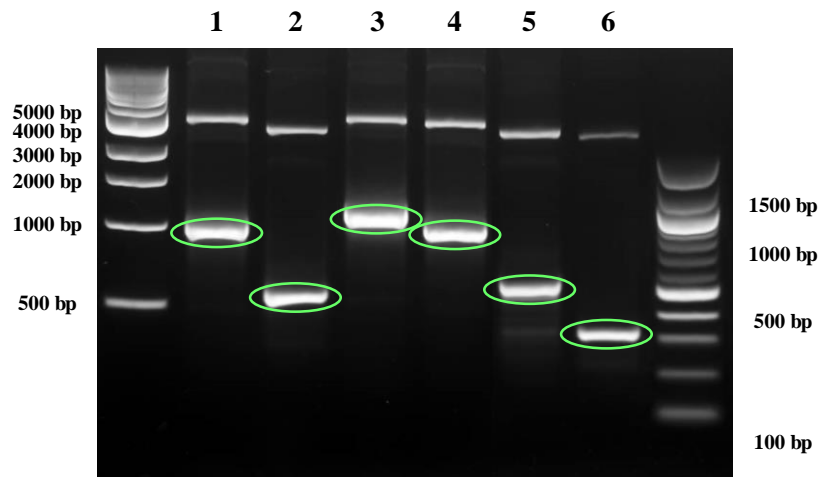


**Abb. 20: PCR-Produkte, die im Rahmen der *random*-PCR aus dem Probenmaterial ZKÜ gewonnen wurden**

Die DNA aus dem ZKÜ wurde vor der Amplifikation behandelt: A = nur DNase; B = aufgereinigte DNA aus Ansatz A; C = mit Restriktionsenzym Csp inkubierte DNA aus Ansatz A; D = aufgereinigte DNA aus Ansatz C

Zur Klonierung verwendete Banden sind durch eine grüne Markierung gekennzeichnet.

Nach Klonierung der isolierten DNA erfolgte eine Qualitätskontrolle, indem mit T3- und T7- Primern die in den gewonnenen Plasmiden inserierten Sequenzen amplifiziert wurden. Diese sollten den Längen der Fragmente aus der jeweiligen *random*-PCR entsprechen (Abbildung 21).



**Abb. 21: Längenkontrolle der in die Plasmide inserierten PCR-Produkte**

Durch BLAST-Analyse wurden zwei von insgesamt sechs klonierten und sequenzierten DNA-Insertionen mit Homologien zum EHV-1-Genom identifiziert. Die restlichen Fragmente wiesen Übereinstimmungen mit Abschnitten des Genoms von *E. coli* auf (Tabelle 22).

**Tab. 22: Ergebnisse der *random*-PCR bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem Zellkulturüberstand**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
1_T7	EHV-1	100	100	877
2_T7	<i>Escherichia coli</i> strain ST540, complete genome	100	100	444
3_T7	<i>Escherichia coli</i> strain ST540, complete genome	99	100	1036
4_T7	EHV-1	99	100	877
5_T7	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MC4100 complete genome	100	100	517
6_T7	<i>Escherichia coli</i> strain ST540, complete genome	100	100	285

#### 4.4.2. Zellsuspension

Bei der Untersuchung von EHV-1-infizierten Zellen konnten lediglich für zwei von zehn sequenzierten DNA-Fragmenten mit Homologien zum EHV-1-Genom gefunden werden. Die restlichen Ergebnisse bezogen sich ausschließlich auf Übereinstimmungen mit dem Genom von *E. coli* (Tabelle 23).

**Tab. 23: Ergebnisse der random-PCR bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltender Zellsuspension**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeckrate (%)	Länge (bp)
1-1_T7	EHV-1	100	100	874
1-2_T7	EHV-1	100	100	874
2-1_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	99	100	442
2-2_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	100	100	442
3-1_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	97	100	1069
3-2_T7	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MC4100 complete genome</i>	99	100	1049
4-1_T7	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MC4100 complete genome</i>	99	100	632
4-2_T7	<i>Escherichia coli O145:H28 str. RM12581, complete genome</i>	100	100	719
5-1_T7	<i>Escherichia coli O25b:H4-ST131 str. EC958 chromosome, complete genome</i>	99	100	571
5-2_T7	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MC4100 complete genome</i>	100	100	515

**4.4.3. Liquor**

Aus einer Gesamtzahl von zehn Klonen konnten keine Homologien zu EHV-1 gefunden werden. Alle Fragmente zeigten ausschließlich Übereinstimmungen mit Sequenzen von *E. coli*.

**4.4.4. Gewebe****4.4.4.1. Lebergewebe**

Unter neun Klonen befand sich ein Klon mit einer Insertion, die Sequenzhomologien zu EHV-1 aufwies. Weiterhin konnten bei sechs Klonen Übereinstimmungen zum *E. coli*-Genom gefunden werden. Die Analyse der restlichen zwei Klone erzielte Übereinstimmungen mit zellulärer equiner bzw. humaner Nukleinsäure (Tabelle 24).

**Tab. 24: Ergebnisse der *random*-PCR bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem Lebergewebe**

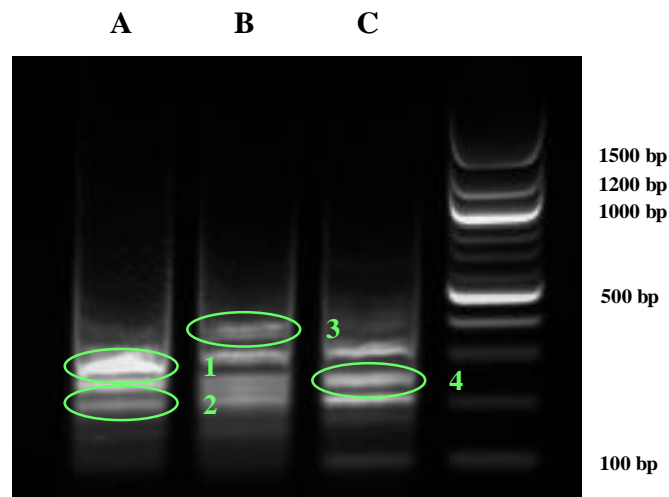
Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
1/2_T7	<i>PREDICTED: Equus caballus ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like (LOC102150545), mRNA</i>	100	36	851
1/3_T7	EHV-1	100	100	852
2/1_T7	<i>Human DNA sequence from clone RP11-180I4 on chromosome 9, complete sequence</i>	78	62	389
3/1_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	99	99	986
3/2_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	99	99	985
4/1_T7	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MC4100 complete genome</i>	100	100	515
4/2_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	100	100	442
5/1_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	100	100	284
5/2_T7	<i>Escherichia coli strain ST540, complete genome</i>	100	100	284

**4.4.4.2. Gehirngewebe**

Die *random*-PCR mit DNA aus Gehirngewebe erfolgte nach Wechsel des PCR-Kits von *ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich) auf *TopTaq™ Master Mix Kit* (Qiagen). Die Gründe dafür werden im nächsten Abschnitt erläutert. Für die Amplifikation wurden verschiedene Aufbereitungsansätze angefertigt: i) nur DNase-Verdau, ii) DNase- und Restriktionsverdau und iii) DNase- und Restriktionsenzymverdau und anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente (Abbildung 22).

Das entstandene Bandenmuster unterschied sich nach dem Wechsel des PCR-Kits durch eine geringe Zahl an PCR-Produkten (vgl. Abbildung 20).

Zehn Klone wurden sequenziert und durch BLAST analysiert. Dabei zeigten sich keine Homologien zu EHV-1. Gefundene Übereinstimmungen beschrieben lediglich zelluläre und bakterielle Genomfragmente, die aber nicht *E. coli* zugeordnet werden konnten (vgl. Anhang, Tabelle 42).



**Abb. 22: PCR-Produkte, die im Rahmen der *random*-PCR aus dem Probenmaterial ZKÜ entstanden**

Die DNA aus dem Gehirn wurde vor der Amplifikation behandelt: A = nur DNase; B = mit Restriktionsenzym Csp inkubierte DNA aus Ansatz A; C = aufgereinigte DNA aus Ansatz B

Zur Klonierung verwendete Banden sind durch eine grüne Markierung gekennzeichnet.

#### 4.4.5. Kontrollen

Um die auffällig hohe Zahl von *E. coli*-Sequenzen in den *random*-PCR-Ansätzen abzuklären, erfolgte eine Kontrolle aller verwendeten Reagenzien auf potentielle Kontaminationen. Das *random*-PCR-Protokoll wurde zu diesem Zweck mit 100 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) anstelle des EHV-1-haltigen Probenmaterials durchgeführt. Hierbei wurden neue, ungeöffnete Reagenzien und Materialien verwendet. Primer wurden mit kommerziellem RNase-freiem Wasser (Qiagen) angesetzt. Überprüft wurden sowohl das RNase-freie Wasser (Qiagen), Extraktionskit (QIAmp® DNA Mini Kit von Qiagen), DPBS (Sigma-Aldrich), Filter (Corning), DNase (Ambion), Restriktionsenzym Csp 6.I (Thermo Fisher Scientific), PCR-Aufreinigungsset (Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega) als auch das PCR-Kit (ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix von Sigma-Aldrich). Dies geschah indem der Probe nach jedem Behandlungsschritt des *random*-PCR-Protokolls 2 µl als *Template* für die PCR mit *random*-Primern entnommen und nachfolgend elektrophoretisch aufgetrennt wurden. In allen Ansätzen entstanden Banden (Abbildung 23). Somit fand eine Amplifikation einer Vielzahl von unspezifischen Produkten statt. Da diese sogar ohne Zugabe einer Probe, also nur durch die Verwendung des PCR-Kits entstanden, wurde für die *random*-PCR mit der DNA aus Gehirngewebe ein Wechsel des PCR-Kits



vorgenommen.

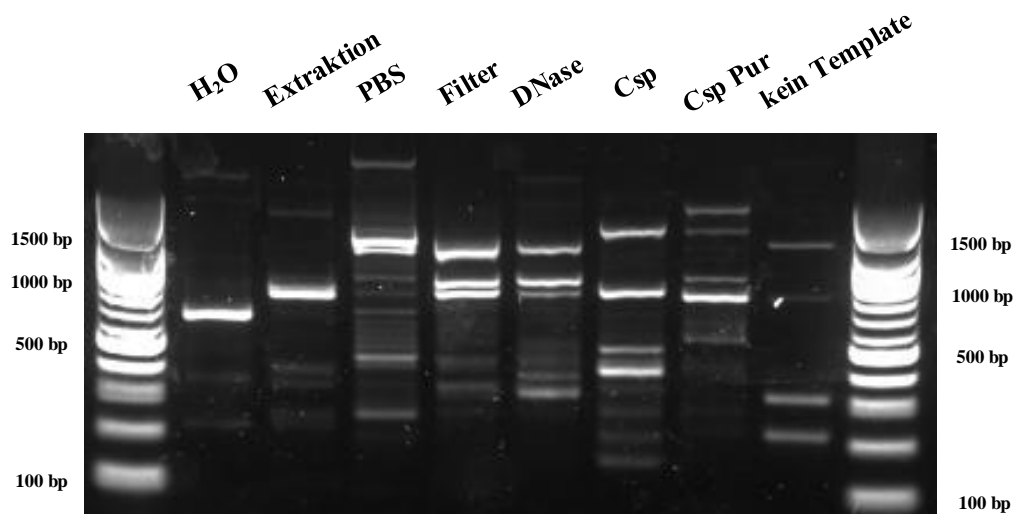


Abb. 23: PCR-Produkte nach PCR mit *random*-Primern zur Überprüfung der einzelnen Schritte und Reagenzien auf Kontaminationen im *random*-PCR-Protokoll

100 µl RNase-freies Wasser (Qiagen) als Ausgangsmaterial wurden ohne Behandlung (H<sub>2</sub>O), nach Extraktion der Nukleinsäuren mit *QIAmp® DNA Mini Kit* (Qiagen) (Extraktion), unter Zumischung von DPBS (Sigma-Aldrich) beim Extraktionsschritt (PBS), mit Filtration (*Costar®-Spin-X®*, Corning) (Filter), nach DNase-Verdau (Ambion) (DNase), Restriktionsverdau mit Csp6.I (Thermo Fisher Scientific) (Csp), Aufreinigung (*Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega) (Csp Pur) und ohne Probe (kein Template) zur Überprüfung des PCR-Kits verwendet.

## 5. Genomabschnitte der Klone mit Homologie zu EHV-1

Die SISPA und rPCR amplifizierten verschiedene DNA-Fragmente mit Homologie zum EHV-1-Genom, wobei die SISPA insgesamt Sequenzen von 18 verschiedenen Lokalisationen im EHV-1-Genom nachwies (Tabelle 25).

Von den 18 detektierten ORFs wurden 13 nur einmal, zwei ORFs zweimal, zwei ORFs dreimal und eine Genlokalisierung viermal nachgewiesen (Tabelle 26).

**Tab. 25: Lokalisationen der mittels SISPA nachgewiesenen EHV-1-Genomsequenzen**

Genom- abschnitt	Klon	Produkt/ Funktion	Quelle
ORF 24	1_T3	Tegumentprotein, Kapsidtransport	ZKÜ
ORF 24	1/3_T3	Tegumentprotein, Kapsidtransport	ZKÜ
ORF 31	1/1_T3	ssDNA-Bindungsprotein, DNA-Replikation	ZKÜ
ORF 33	2/2_T3	Envelope-Glykoprotein B, Zellinvasion	ZKÜ
ORF 35	2_T3	Kapsidprotease, Kapsidmorphogenese	ZKÜ
ORF 42	3_T3	Hauptkapsidprotein, Kapsidmorphogenese	ZKÜ
ORF 46	1/2_T3	Tegumentprotein	ZKÜ
ORF 14	1b_T7	Tegumentprotein	Zellen
ORF 18	6_T7	DNA-Polymerase-Produktivitätsfaktor, DNA-Replikation	Zellen
ORF 20	2b_T7	Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit, Nukleotidmetabolismus	Zellen
ORF 24	7_T7	großes Tegumentprotein, Kapsidtransport	Zellen
ORF 28	2a_T7	DNA-verpackendes Protein, DNA-Enkapsidierung	Zellen
ORF 29	3/1_T3	<i>nuclear egress lamina protein, nuclear egress</i>	Zellen
ORF 31	3/2_T3	ssDNA-Bindungsprotein, DNA-Replikation	Zellen
ORF 36	1/1_T3	DNA-verpackendes Tegumentprotein UL 25, DNA-Enkapsidierung	Zellen
ORF 36	1/1_T7	DNA-verpackendes Tegumentprotein UL 25, DNA-Enkapsidierung	Zellen
ORF 36	3_T7	DNA-verpackendes Tegumentprotein UL 25, DNA-Enkapsidierung	Zellen
ORF 71	1/2_T3	Membranglykoprotein	Zellen
ORF 71	1a_T7	Membranglykoprotein	Zellen
ORF 71	1/2_T7	Membranglykoprotein	Zellen
-	5_T7	<i>host range factor</i> ; Virionprotein Us10	Zellen
ORF 5	1_1_T7	multifunktionaler Expressionsregulator, RNA-Metabolismus und -Transport, Genregulation	Leber
ORF 36	3_2_T7	Virionprotein, DNA-Enkapsidierung	Leber
ORF 44+ 45	3_1_T7	ORF 44: Untereinheit von DNA-verpackender Terminase, DNA-Enkapsidierung; ORF 45: DNA-verpackendes Tegumentprotein, DNA-Enkapsidierung	Leber
ORF 56	1_2_T7	Kapsidprotein, DNA-Enkapsidierung	Leber
ORF 60	2_1_T7	Kernprotein	Leber
ORF 60	2_2_T7	Kernprotein	Leber

Markierungen derselben Farbe entsprechen Klonen mit PCR-Fragmenten aus derselben Bande mit unterschiedlichen Lokalisationen im EHV-1-Genom.

**Tab. 26: Häufigkeiten der Lokalisationen der mittels SISPA nachgewiesenen EHV-1-Genomsequenzen**

ORF	1x	2x	3x	4x
5	✓	-	-	-
14	✓	-	-	-
18	✓	-	-	-
20	✓	-	-	-
24	-	-	✓	-
28	✓	-	-	-
29	✓	-	-	-
31	-	✓	-	-
33	✓	-	-	-
35	✓	-	-	-
36	-	-	-	✓
42	✓	-	-	-
44	✓	-	-	-
45	✓	-	-	-
46	✓	-	-	-
56	✓	-	-	-
60	-	✓	-	-
71	-	-	✓	-

Mehrfachzuordnungen stammten in einem Fall aus derselben Bande des SISPA-Ansatzes (2\_1\_T7 und 2\_2\_T7, ORF 60 aus Leber) bzw. in zwei Fällen (Klone 1/1 und 1/2 aus Zellen, ORF 36 und 71) wurde ein Klon doppelt sequenziert. Die jeweiligen Fragmente überlagern sich also. Im Gegensatz dazu wurden aber ebenso unterschiedliche ORFs aus einer Bande des SISPA-Produktes nachgewiesen. Die entsprechenden Klone sind in Tabelle 25 farblich markiert. Die übrigen Mehrfachzuordnungen (ORF 31 und 24) befinden sich an unterschiedlichen Stellen innerhalb derselben ORFs, überlappen sich also nicht. Sie stammen aus unterschiedlichen PCRs und/ oder aus unterschiedlichen Probenmaterialien.

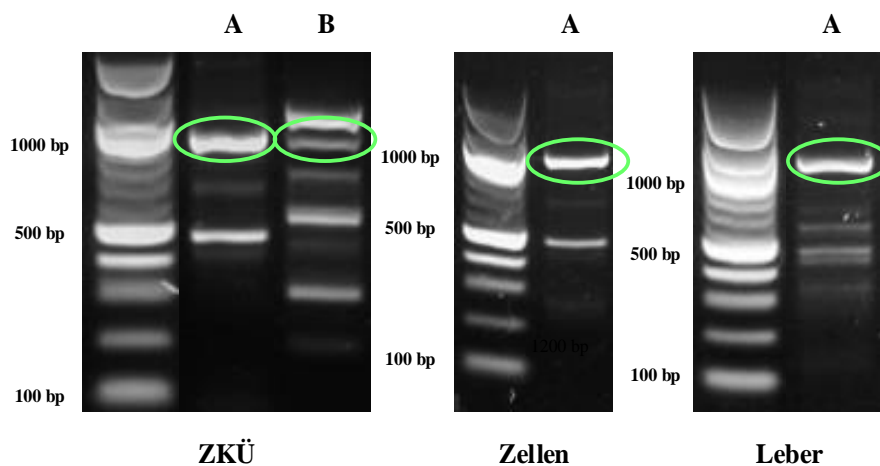
Im Vergleich dazu konnten mittels rPCR insgesamt nur fünf EHV-1-Fragmente amplifiziert und detektiert werden (Tabelle 27).

Die vier Fragmente mit ORF 29 und 30 als nachgewiesene EHV-1-Sequenzen stammten aus dem gleichen Aufbereitungsansatz der PCR (DNase-verdaute DNA) bzw. einmalig aus einem anderen Ansatz (DNase-verdaute und aufgereinigte DNA). Beide Ansätze ergaben regelmäßig eine Bande im 1000-bp-Bereich. Das andere Fragment (ORF 23) wurde ebenso aus der 1000-bp-Bande der DNase-

verdauten DNA isoliert (Abbildung 24).

**Tab. 27: Lokalisationen der mittels *random*-PCR nachgewiesenen EHV-1-Genomsequenzen**

Genom- abschnitt	Klon	Produkt/ Funktion	Quelle
ORF 29 + 30	1_T7	29: <i>nuclear egress lamina protein</i> 30: DNA-Polymerase, DNA-Replikation	ZKÜ
ORF 29 + 30	4_T7	29: <i>nuclear egress lamina protein</i> 30: DNA-Polymerase, DNA-Replikation	ZKÜ
ORF 29 + 30	1-1_T7	29: <i>nuclear egress lamina protein</i> 30: DNA-Polymerase, DNA-Replikation	Zellen
ORF 29 + 30	1-2_T7	29: <i>nuclear egress lamina protein</i> 30: DNA-Polymerase, DNA-Replikation	Zellen
ORF 23	1/3_T7	Tegumentprotein	Leber



**Abb. 24: PCR-Produkte aus der *random*-PCR-Methode, die nach Klonierung und Sequenzierung Sequenzhomologien zu EHV-1 aufwiesen**

Die Klone, deren BLAST-Analyse Homologien zum Genom von EHV-1 zeigte, stammten jeweils aus den PCR-Produkten, die sich im Agarosegel bei ca. 1000 Basenpaaren darstellten (grüne Markierung). Man beachte, dass sich diese Banden jeweils im gleichen Aufbereitungsansatz (nur DNase-Inkubation, A) bzw. einmalig in einem anderen Aufbereitungsansatz (DNase-Inkubation und DNA-Aufreinigung, B) befanden.

Von den zwei verschiedenen detektierten Lokalisationen wurden eine (ORF 29 + 30) viermal und die andere Stelle (ORF 23) einmal nachgewiesen (Tabelle 28). Die PCR-Fragmente mit Homologien zu ORF 29 + 30 besitzen dieselbe Lokalisation innerhalb der beiden ORFs, sie überlagern sich also.

**Tab. 28: Häufigkeiten der Lokalisationen der mittels *random*-PCR nachgewiesenen EHV-1-Genomsequenzen**

ORF	1x	2x	3x	4x
23	✓	-	-	-
29+30	-	-	-	✓

## 6. Länge der Fragmente mit EHV-1-Sequenzhomologie

Die nachgewiesenen DNA-Fragmente, die Sequenzhomologien zu EHV-1 aufwiesen, unterschieden sich bei SISPA und rPCR deutlich in ihrer Länge. Bei der SISPA-Methode erstreckten sich die Fragmentlängen über einen Bereich von 227 bis 460 bp (Tabelle 29). Bis auf wenige Ausnahmen besaß jedes Fragment eine individuelle Länge.

**Tab. 29: Fragmentlängen der mittels SISPA nachgewiesenen EHV-1-Sequenzen**

Klon	Fragment-länge (bp)	Treffer-länge (bp)	Abdeck-rate (%)	Quelle
1_T3	252	235	92	ZKÜ
2_T3	380	380	100	ZKÜ
3_T3	252	252	100	ZKÜ
1/1_T3	374	374	100	ZKÜ
1/2_T3	357	358	100	ZKÜ
1/3_T3	394	395	100	ZKÜ
2/2_T3	405	138	34	ZKÜ
1/1_T3	365	360	98	Zellen
1/1_T7	365	365	100	Zellen
1/2_T3	381	340	88	Zellen
1/2_T7	227	176	77	Zellen
3/1_T3	304	260	85	Zellen
3/2_T3	381	330	86	Zellen
1a_T7	339	339	100	Zellen
1b_T7	366	343	100	Zellen
2a_T7	246	230	93	Zellen
2b_T7	241	241	100	Zellen
3_T7	362	362	100	Zellen
5_T7	342	342	100	Zellen
6_T7	233	233	100	Zellen
7_T7	266	266	100	Zellen
1_1_T7	424	424	100	Leber
1_2_T7	460	460	100	Leber
2_1_T7	391	391	100	Leber
2_2_T7	391	391	100	Leber
3_1_T7	350	350	100	Leber
3_2_T7	313	313	100	Leber

Die entsprechenden Fragmente aus den Klonen der rPCR-Methode wiesen Längen in einem Bereich von 852 bis 877 bp auf (Tabelle 30). Mit einer Ausnahme lagen die Homologien aller Fragmente in demselben Genomabschnitt (ORF 29 und 30) mit nahezu identischen Längen (874 und 877 bp). Nur ein Fragment wies eine Homologie zu einer anderen Lokalisation (ORF 23) und eine geringfügig kürzere Länge (852 bp) auf.

**Tab. 30: Fragmentlängen der mittels *random*-PCR nachgewiesenen EHV-1-Sequenzen**

Klon	Fragment-länge (bp)	Treffer-länge (bp)	Abdeck-rate (%)	Quelle
1_T7	877	877	100	ZKÜ
4_T7	877	877	100	ZKÜ
1-1_T7	874	874	100	Zellen
1-2_T7	874	874	100	Zellen
1/3_T7	852	852	100	Leber

Die durchschnittliche Länge der Fragmente der SISPA-Methode betrug 339 bp, die der rPCR-Methode 870 bp (Tabelle 31).

**Tab. 31: Kürzeste und längste Fragmente (in Basenpaaren) aller Klone mit Sequenzhomologien zu EHV-1 aus SISPA und *random*-PCR**

	kürzestes Fragment (bp)	längstes Fragment (bp)	Durchschnitt (bp)
SISPA	277	460	339
rPCR	852	877	870

## 7. Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse beider Methoden

Die SISPA und *random*-PCR führten zu unterschiedlichem Erfolg hinsichtlich des Nachweises von EHV-1 durch sequenzunabhängige Amplifikation, Klonierung, Sequenzierung und BLAST-Suche (Tabelle 32). Unterschiede zeigten sich weiterhin bezüglich der Abschnitte des EHV-1-Genoms, zu denen durch Klonierung und Sequenzierung ausgewählter DNA-Fragmente Übereinstimmungen gefunden werden konnten, als auch bezüglich der Länge und Herkunft dieser Fragmente.

**Tab. 32: Anteil der Klone mit nachgewiesener Sequenzhomologie zu EHV-1 an der Gesamtzahl der analysierten Klone aus der SISPA und *random*-PCR im Vergleich**

	<b>SISPA</b>	<b><i>random</i>-PCR</b>	<b>Ct-Wert</b>
<b>ZKÜ</b>	7/12	2/6	<b>19,97</b>
<b>Zellen</b>	14/21	2/10	<b>19,97</b>
<b>Liquor</b>	0/9	0/10	<b>34,06</b>
<b>Leber</b>	6/7	1/9	<b>19,68</b>
<b>Gehirn</b>	0/38	0/10	<b>24,04</b>
<b>gesamt</b>	<b>27/87</b>	<b>5/45</b>	<b>-</b>

Bei beiden Methoden waren durch die BLAST-Suche Sequenzhomologien zu EHV-1 mit Klonen aus ZKÜ, Zellen und Leber möglich. Die Materialien Liquor und Gehirn führten bei beiden Methoden zu keinem Virusnachweis.

Mit der SISPA-Methode konnten sowohl für die einzelnen Probenmaterialien als auch gesamt mehr positive Ergebnisse erzielt werden als mit der *random*-PCR-Methode. Die Gesamtzahl an analysierten Klonen war bei der SISPA ca. doppelt so hoch wie bei der rPCR. Dies lag zum einen am Primerwechsel bei den SISPA-Klonen aus dem Zellmaterial. Zum anderen wurde versucht, durch eine Erhöhung des Sequenzierungsaufkommens beim Gehirnmateriale die Wahrscheinlichkeit des EHV-1-Nachweises zu erhöhen. Aufgrund des ausgebliebenen Erfolgs wurde dies nachfolgend bei der rPCR nicht wiederholt.

Die Sequenzhomologien der DNA-Fragmente aus den restlichen Klonen der SISPA und rPCR können unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (Tabelle 33).

**Tab. 33: Herkunft der nachgewiesenen Sequenzen, die nicht EHV-1 zuzuordnen waren (\*außer *E. coli*)**

	<b>SISPA</b>	<b><i>random</i>-PCR</b>
<b>Wirt</b>	17	2
<b>Bakterien/ Pilze*</b>	9	6
<b><i>E. coli</i></b>	-	28
<b>Vektor</b>	11	-
<b>Sonstiges</b>	23	4
<b>gesamt</b>	<b>60</b>	<b>40</b>

Neben Übereinstimmungen zum Genom unterschiedlicher Bakterien, Pilze und zu Vektorsequenzen waren die Klone der SISPA-Methode, die keine Homologien zu EHV-1 aufwiesen, vor allem der Wirts-DNA und sonstigen

---

Nukleinsäuresequenzen anderer Organismen zuzuordnen. Die entsprechenden Klone der rPCR-Methode beinhalteten zum größten Teil Sequenzhomologien zum Genom von *E. coli*.



## **VI. DISKUSSION**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die SISPA und *random*-PCR als sequenzunabhängige Methoden zum Virusnachweis am Modell des Equinen Herpesvirus-1 als Vertreter doppelsträngiger DNA-Viren vergleichend getestet werden. Diese Methoden könnten als eine unkomplizierte, universell anwendbare, kostengünstige und schnelle Herangehensweisen zur Diagnostik unbekannter bzw. unvermuteter Viren dienen, die in einem durchschnittlichen Diagnostiklabor ohne spezielle kostenintensive Geräte und bioinformatische Expertise durchführbar sind. Die Notwendigkeit solcher Methoden scheint in der Tiermedizin in besonderen Maß gegeben.

Nach physikalischen (Homogenisierung, Zentrifugation, Filtration) und chemischen (DNase-Verdau) Anreicherungsverfahren wurde die Methodik der SISPA und *random*-PCR in Kombination mit der Sanger-Sequenzierung angewendet, um EHV-1 durch BLAST-Suche wiederzufinden. Ein entscheidender Faktor war die Effizienz der DNase, die die freie DNA unter Schonung der viralen DNA abbauen und somit die relative Virusmenge in der Probe erhöhen sollte. Das Viruskapsid war dabei die Voraussetzung für die Protektion viraler DNA. Diese Verfahrensweise wurde mit verschiedenen Probenmaterialien (ZKÜ, Zellen, Liquor, Leber- und Gehirngewebe) mit absteigender Viruskonzentration und ansteigender Fremd-DNA-Menge durchgeführt.

### **1. Diskussion der Ergebnisse aus den Vorversuchen**

#### **1.1. Wirksamkeit der DNase und protektive Wirkung des Viruskapsids**

Aufgrund der natürlicherweise sehr viel geringeren Mengen an Virusgenomen in einer Probe (Steinman, 1975; Daly *et al.*, 2011) im Vergleich zu Fremd-DNA (Wirt, Bakterien) wurde sowohl für die SISPA als auch für die rPCR eine Vorbehandlung durchgeführt. Diese sollte durch physikalische, besonders aber durch enzymatische Schritte, zu einer relativen Virusanreicherung führen (Allander *et al.*, 2001). Während Homogenisierung, Zentrifugation und Filtration der groben Vorselektion und Abtrennung zellulärer und bakterieller Fragmente dienen sollte (Thurber *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2014), wurde eine Desoxyribonuklease (DNase) für die hydrolytische Spaltung freier DNA

eingesetzt (Prince *et al.*, 1998; Cockerill, 2011; Landry und Levin, 2014). Bei diesem Vorgang wird der Theorie nach virale DNA, die in Form von Virionen durch das Kapsid und ggf. durch eine Hülle umgeben ist, vor der Enzymwirkung geschützt und somit in der Probe relativ erhöht (Allander *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2005; Qiu, 2012). Nach dieser Vorbehandlung kann die derartig angereicherte virale DNA unter Abtrennung der Kapside freigesetzt, ggf. weiterbehandelt, in der PCR amplifiziert und als solche charakterisiert werden (Allander *et al.*, 2001).

Diese Theorie sollte in dieser Arbeit zunächst geprüft werden. Als erstes wurde hierzu die DNA-abbauende Wirkung der DNase getestet. Reine DNA, die aus EHV-1-haltigem ZKÜ extrahiert worden war, wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen der *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) inkubiert und durch *real time*-PCR gemessen. Auf diese Weise konnte in den enzymbehandelten Ansätzen eine Reduktion der messbaren DNA um das 260000-Fache gezeigt werden. Quantifizierungen in der Literatur sind spärlich und basieren auf unterschiedlichen Enzymanwendungen. Während manche Autoren nur *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) verwendeten (Phongsisay *et al.*, 2007; Greninger *et al.*, 2010), nutzten andere weitere Produkte der DNase I (Allander *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2011) bzw. Kombinationen von DNasen und RNasen (Victoria *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2009; Rosseel *et al.*, 2014). Bei Jones *et al.* (2007a) war die *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion) zwar anderen Produkten der DNase I überlegen, konnte jedoch nur in Kombination mit einer zweiten DNase zur Entfernung von DNA unter dem Sensitivitätslevel der PCR (<1 pg DNA) führen. Greninger *et al.* (2010) verzichteten auf physikalische Anreicherungsverfahren und verwendeten stattdessen nur die *Turbo<sup>TM</sup>DNase* (Ambion). Dies resultierte in einem unvollständigen DNA-Abbau und die Autoren nahmen an, dass zusätzliche physikalische Vorbehandlungen zu einer effizienteren Entfernung der Fremd-DNA geführt hätten. Angaben über Sequenzierungsergebnisse (Sequenzen von Wirt und Bakterien) geben Aufschlüsse darüber, dass eukaryotische DNA unabhängig von den verwendeten Enzymen und ihren Kombinationen regelmäßig nur unvollständig abgebaut wurde (Allander *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005; Allander *et al.*, 2007; Kirkland *et al.*, 2007), was sich vor allem bei *next-generation*-Sequenzierungsansätzen in einem hohen Anteil nichtviraler *reads* bemerkbar machte (Ge *et al.*, 2012; Lysholm *et al.*, 2012; Rosseel *et al.*, 2012; Bodewes *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2014). Es ist daher davon auszugehen, dass eine Nukleasebehandlung freie DNA reduzieren, aber nicht vollständig abbauen kann

(Thurber *et al.*, 2009). Die Überprüfung durch *real time*-PCR-Messung war zu diesem Zweck besonders geeignet, da der verwendete *Assay* ein Fragment von nur 57bp Länge detektiert (Goodman *et al.*, 2006). Dies spricht dafür, dass die DNA durch das Enzym in nicht mehr detektierbare, kleine Fragmente gespalten wurde, die in der Folge auch nicht mehr kloniert und sequenziert werden dürften.

Da die SISPA und rPCR zur Testung sämtlicher Probenmaterialien geeignet sein sollten, folgte als nächstes die Prüfung der Effizienz des enzymatischen DNA-Abbaus in Anwesenheit von Gewebekomponenten. Reine EHV-1-DNA, die aus ZKÜ gewonnen worden war, wurde zu diesem Zweck ohne Gewebezusatz und mit EHV-1-freiem Gehirn- bzw. Lebergewebe gemischt bzw. gespikkt. Mit allen drei Probenansätzen wurde jeweils eine DNase-Behandlung vergleichend zu einem unbehandelten Ansatz (Positivkontrolle) durchgeführt und mittels *real time*-PCR gemessen. Während der DNase-Verdau der reinen DNA zu einer ca. 8000-fachen Reduktion führte, resultierte der Ansatz mit Gehirn bzw. Leber lediglich in einer 128-fachen bzw. 16-fachen Reduktion im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle. Zusätzlich konnte eine Verringerung der Ausgangsmenge an EHV-1-DNA in den gespikkten Positivkontrollen beobachtet werden. Diese könnte auf die Anwesenheit endogener Nukleasen in den Organen zurückzuführen sein (Fischer *et al.*, 2011; Mizuta *et al.*, 2013; Pereira-Lopes *et al.*, 2013; Kawane *et al.*, 2014).

In Anwesenheit von Gewebe wurde somit deutlich weniger EHV-1-DNA verdaut. Es ist zu berücksichtigen, dass Frier-Tau-Zyklen vor allem genomische DNA freisetzen und Kapside einer Kältebehandlung gegenüber resistenter sind (Firth und Lipkin, 2013; Hall *et al.*, 2014). Somit steigt der Anteil absoluter freier DNA in einer Gewebeprobe stark an, was die Wirkung der DNase beeinträchtigen kann (Kirkland *et al.*, 2007).

Zudem kann von nicht abfiltrierbaren Gewebekomponenten eine hemmende bzw. störende Wirkung auf den enzymatischen DNA-Abbau ausgehen, denkbar etwa in Form einer sterischen Hinderung (Carey *et al.*, 2013). Das Prinzip der DNA-Protein-Interaktion wird im Bereich der Genexpressionsforschung beim *DNase Footprinting Assays* zur Identifizierung von Promoterregionen ausgenutzt. Dabei wird DNA mit und ohne Proteinzugabe mit einer DNase inkubiert. Da die Proteine durch Bindung an spezifische Stellen am DNA-Molekül die enzymatische Spaltung an diesen Stellen verhindern können, entstehen bei der vergleichenden Auftrennung der entstandenen Fragmente beider Ansätze dort

Lücken (sog. *footprints*) im Bandenmuster, wo eine Proteinbindung die Spaltung verhindert hat (Connaghan-Jones *et al.*, 2008; Leblanc und Moss, 2009; Carey *et al.*, 2013).

Weiterhin wird von endogenen DNase-Inhibitoren berichtet, von denen vermutet wird, dass viele noch nicht identifiziert sind (Kolarevic *et al.*, 2014).

Nach der Bestätigung der generellen Wirksamkeit der DNase sollte die Hypothese des protektiven Viruskapsids überprüft werden. Dazu wurde EHV-1-DNA aus ZKÜ, Leber und Gehirn vor und nach Extraktion der Nukleinsäuren, die unter anderem die Kapside entfernt, mit DNase behandelt und durch *real time*-PCR gemessen. Dem EHV-1-enthaltenden Gehirnmateriel wurde dabei besonderes Interesse zuteil, da die aktive Replikation des Virus und damit verbunden das Vorkommen freier Virionen im Fall einer ZNS-Infektion mit EHV-1 angezweifelt wird. Vielmehr macht man eine Ischämie, Blutungen und eine Entzündung des Neuroparenchyms mit einhergehender zerebrospinaler Vaskulitis und Thrombosen für das klinische Bild der neuronalen Form der EHV-1-Infektion, der equinen Herpesvirusmyeloenzephalopathie (Ma *et al.*, 2013), verantwortlich (Kohn und Fenner, 1987; Yamada *et al.*, 2008). Ein für Alphaherpesviren typischer axonaler Transport mit darauffolgender Latenz im Trigeminalganglion ist bekannt (Greber, 2005; Zaichick *et al.*, 2011), dieses Stadium geht jedoch ohne Ausbildung von Kapsiden einher (van der Meulen *et al.*, 2006; Dunowska, 2014) und ist somit durch die hier verwendeten Methoden nicht detektierbar (Rosseel *et al.*, 2013). Slónska *et al.* (2014) berichten über die aktive Replikation des EHV-1 in primären murinen Neuronen.

Die PCR-Messung der reinen EHV-1-DNA aus ZKÜ zeigte eine deutliche Reduktion nach, sowie eine Stabilität vor der Extraktion. Diese Beobachtungen zeigen erneut die Wirksamkeit der DNase (nach Extraktion) und sprechen klar für das Vorliegen einer Schutzwirkung (vor Extraktion). Im Gegensatz dazu war bei Gehirn und Leber neben einer Reduktion der DNA nach Extraktion auch eine vergleichsweise geringere Reduktion der DNA vor Extraktion der Nukleinsäuren festzustellen (3 bzw. 2 Cts bei Gehirn bzw. Leber, d. h. eine 8- bzw. 4-fache Reduktion). Die virale DNA wurde somit unerwarteterweise größtenteils sowohl im Gehirn- als auch im Lebermaterial vor der Enzymwirkung geschützt. Dabei bleibt aber ungeklärt, ob der beobachtete Effekt kapsidassoziiert oder auf eine Hemmung der DNase zurückzuführen ist. Die erfolgreiche Durchführung der

SISPA und rPCR bei der Verwendung des Lebergewebes spricht für ein (zumindest teilweises) Vorkommen kapsidgeschützter viraler Nukleinsäure in diesem Gewebe. Weiterhin deuten Berichte über erfolgreiche Virusnachweise aus Leber- (Daly *et al.*, 2011) und Gehirnmateriale (Victoria *et al.*, 2008; Rosseel *et al.*, 2012) auf die Existenz von Kapsiden in diesen Proben hin. Zwar können durch NGS-Ansätze aufgrund ihrer höheren Sensitivität (Victoria *et al.*, 2009) virale Sequenzen generell auch ohne kapsidabhängige Anreicherungsverfahren in einer Probe wiederentdeckt werden (Hall *et al.*, 2014). Jedoch scheint dies nicht regelmäßig auf die Durchführung mit Gewebeproben zuzutreffen, wie es am Beispiel von Leberbiopsaten gezeigt wurde (Daly *et al.*, 2011).

### **1.2. Verlust viraler DNA bei Durchführung des SISPA- bzw. random-PCR-Protokolls**

Die Schritte, die der relativen Virusanreicherung dienen sollten, führten zu einer graduellen Reduktion an EHV-1-DNA, wie es am Beispiel des EHV-1-haltigen ZKÜ dargestellt wurde. Im Detail betrug diese - ausgehend von einer unbehandelten Positivkontrolle bis hin zur Ligation - ungefähr den Faktor 250, wobei vor allem die Schritte der Filtration (2-fache Reduktion), Aufreinigung (8-fache Reduktion) und Ligation (16-fache Reduktion, jeweils am unverdünnten ZKÜ gemessen) zum Verlust der messbaren DNA führten. Bei der Ligation sind allerdings verdünnungsassoziierte Effekte zu berücksichtigen, da die DNA-Menge bereits durch das Ansetzen der Ligationsreaktion vor der *real time*-PCR-Messung verdünnt worden war. Die realen Verluste an EHV-1-DNA durch die Ligation sind daher als geringer anzusehen.

Während Daly *et al.* (2011) zeigten, dass Anreicherungsverfahren (Homogenisierung, Frier-Tau-Zyklen und Nukleasebehandlung) zu einer messbaren Erhöhung viraler Nukleinsäure führten, sprechen andere Berichte gegen eine solche Erhöhung. Thurber *et al.* (2009) geben an, dass jede Behandlung zum Verlust von Virionen führt. Diese können auf Filtermembranen immobilisiert, während der Lagerung zerstört oder an größere Partikel adsorbiert werden. Stang *et al.* (2005) ermittelten für das Herpes-simplex-Virus-1 im unbehandelten ZKÜ  $6 \times 10^9$  Genomkopien/ml. Nach der DNase-Behandlung konnten nur noch  $2 \times 10^8$  Genomkopien/ml gemessen werden, d. h. es fand eine Reduktion um den Faktor 30 statt. Zwischen den beiden Messungen wurden eine Zentrifugation, Filtration und Ultrazentrifugation durchgeführt.

Hall *et al.* (2014) verglichen den Effekt verschiedener Anreicherungsverfahren auf den Gehalt von menschlicher, bakterieller und viraler Nukleinsäure. Zunächst bestimmten sie die Menge an Nukleinsäure der verschiedenen Quellen vor und nach Anreicherung durch *real time*-PCR-Messung. Dabei führte jede Behandlung zu einer Reduktion: Menschliche und bakterielle Nukleinsäuren konnten am effizientesten durch Zentrifugation, Filtration und Nukleasebehandlung abgebaut werden, was in einer maximal 100-fachen-Reduktion resultierte. Virale Nukleinsäure wurde dabei jedoch ebenso abgebaut (10- bis 100-fache Reduktion). Als nächstes untersuchten sie durch *next-generation*-Sequenzierung die relative Abundanz der verschiedenen Organismen nach der viralen Anreicherung. Dabei führten die Anreicherungsverfahren zu maximal 6-facher bzw. zu 15% Reduktion der menschlichen bzw. bakteriellen Sequenzen verglichen zu Ansätzen ohne durchgeführte Anreicherung. Virale Sequenzen konnten nach der Anreicherung im Fall von drei untersuchten Viren anders als erwartet gar nicht bis hin zu 20-fach häufiger entdeckt werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer hohen Viruslast im Ausgangsmaterial (Victoria *et al.*, 2008).

## **2. Diskussion der Ergebnisse der SISPA- und *random*-PCR-Methode**

Beide Methoden wurden mit jeweils denselben Probenmaterialien durchgeführt. Nach relativer Virusanreicherung, methodenspezifischer Amplifikation und Klonierung wurden pro Ansatz ca. zehn Klone sequenziert und mittels BLAST-Suche auf Nukleotidebene auf Übereinstimmungen mit dem Genom des EHV-1 überprüft.

### **2.1. SISPA**

Sowohl beim ZKÜ als auch bei den Zellen resultierte die Sequenzierung der ausgewählten klonierten PCR-Produkte in vielen Fällen zu Homologien zu dem Plasmid *pCRm-luc2-PHLEO*, dessen Sequenz sich wiederum stark mit dem verwendeten Kloniervektor *pCR®4-TOPO* deckte. Nach einem Wechsel des Sequenzierungsprimers und der damit verbundenen Sequenzierung des komplementären Strangs konnte diese Übereinstimmung nicht mehr festgestellt werden. Sequenzierungsprimer werden generell zur Initiierung der

Sequenzierungsreaktion benötigt. Die hier verwendeten Primer unterscheiden sich durch die Lokalisation der *priming site*, die auf dem jeweils komplementären Strang des Plasmids und auf den gegenüberliegenden Seiten der Insertionsstelle liegen (s. Anhang, Abbildung 26). Der Sachverhalt bestätigte den Verdacht des Vorliegens eines technischen Problems.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Gewebe einerseits aufgrund der hohen Menge zellulärer DNA ein anspruchsvolles Probenmaterial darstellt (Daly *et al.*, 2011) und andererseits das zur Überprüfung vorliegende Gehirngewebe um das 16-Fache weniger Virus enthielt als ZKÜ und Zellen, war die Wahrscheinlichkeit mit zehn Klonen Sequenzhomologien zu EHV-1 zu erzielen vergleichsweise geringer. Aus diesem Grund wurde die Zahl an analysierten Klonen angehoben. Das untersuchte Gehirngewebe erbrachte nach BLAST-Analyse von Insertionen aus 38 Klonen keine Übereinstimmungen mit dem Virus. Stattdessen waren Sequenzübereinstimmungen folgenden Gruppen zuzuordnen: Wirt (17/38), Mensch (13/38), Bakterien (1/38), sonstige Eukaryoten (7/38). Es ist möglich, dass Fremd-DNA aufgrund des ungenügenden enzymatischen Abbaus im Probenmaterial verbleibt, amplifiziert und kloniert wird und somit als mögliches Ergebnis der BLAST-Suche auftreten kann (Allander *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005; Allander *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2014). Die Sequenzierungsqualität konnte mit einer Ausnahme als gut bis sehr gut bewertet werden. Jedoch waren die Werte für Identität und Abdeckrate niedrig, d. h. also dass die verglichenen Genomstrukturen aus der Datenbank kürzer waren und diese viele Fehlpaarungen in Bezug auf die eingesetzten Insertionen aufwiesen. Dies spricht gegen die tatsächliche Anwesenheit der genannten Organismen im Probenmaterial, jedoch könnten mit ihnen verwandte Sequenzen vorgelegen haben (Jones *et al.*, 2005). Eine Ausnahme stellt Klon G1/3\_T7 dar. Die erzielte Homologie zu mitochondrialer DNA des Wirts (Pferd) wies aufgrund maximaler Werte für Identität und Abdeckrate auf eine tatsächliche Amplifikation und Klonierung mitochondrialer DNA hin. Breitbart und Rohwer (2005) und Ng (2009) nannten die Notwendigkeit einer Chloroformbehandlung, um die mitochondriale DNA über eine Zerstörung der Zellwand für die DNase erreichbar zu machen. Van der Hoek *et al.* (2004) wiederum sehen durch die physikalischen Anreicherungsschritte und durch die DNase-Anwendung Mitochondrien und deren Nukleinsäure für weitgehend eliminiert an. Greninger *et al.* (2010) erhielten trotz DNase-Behandlung viele mitochondriale Sequenzen.

## 2.2. *Random-PCR*

In allen Probenmaterialien (außer Gehirn) wurde eine hohe Zahl an Homologien zum *E. coli*-Genom gefunden. Die durchgeführte Kontroll-PCR lieferte starke Hinweise auf das Vorliegen einer Kontamination (s. VI.3.).

Für die *random*-Amplifikation des Gehirngewebes wurde daher statt dem vorher verwendeten *ReadyMix<sup>TM</sup>Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich) das *TopTaq<sup>TM</sup> Master Mix Kit* (Qiagen) verwendet. Gefundene Übereinstimmungen bezogen sich unter anderem auf bakterielle Genomfragmente, die aber nicht von *E. coli* stammten. Aufgrund der niedrigen Werte für Identität und Abdeckrate sind diese Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht repräsentativ für die in der Probe amplifizierte DNA. Eine Ausnahme stellt Klon 2b dar, mit hundertprozentiger Identität und Abdeckrate zu *Propionibacterium acnes*. Hierbei handelt es sich um einen gewöhnlichen Kommensalen auf menschlicher Haut (Brueggemann *et al.*, 2004) und sehr wahrscheinlich um einen Nachweis einer bakteriellen Kontamination im Probenmaterial aufgrund eines unvollständigen DNA-Abbaus durch die DNase (Hall *et al.*, 2014).

## 2.3. *Interpretation unter quantitativen Aspekten*

Generell konnte durch beide Methoden EHV-1-DNA aus ZKÜ, Zellen und Leber nachgewiesen werden. Die Materialien Liquor und Gehirn führten jedoch bei beiden Methoden zu keinen Produkten, die Übereinstimmungen mit dem Virus zeigten. Einen Grund dafür könnten die im Vergleich zu den anderen Materialien geringeren Ausgangsvirusmengen an EHV-1-DNA darstellen (vgl. Tabelle 32). Eine zusätzliche Reduktion durch die Behandlungsschritte der SISPA und rPCR konnte gezeigt werden. Es wird daher vermutet, dass für einen erfolgreichen Virusnachweis mit der SISPA- und der rPCR-Methode eine relativ hohe Viruslast vorliegen muss. Diese Vermutung steht im Einklang mit den Werten in der Literatur. Sensitivitätsangaben zur Methodik der SISPA und rPCR aus der Literatur sind soweit vorhanden größtenteils in einem ähnlichen Bereich angesiedelt. Für die SISPA werden  $10^4$ - $10^6$  Virionen (Rosseel *et al.*, 2012),  $10^5$ - $10^6$  Genomequivalente/ml (Allander *et al.*, 2001) oder  $10^6$  Partikel pro SISPA-Reaktion (Djikeng *et al.*, 2008) genannt. Eine Quantifizierung der Virusmengen sollte nur mit Vorsicht mit der Sensitivität gleichgesetzt werden, da diese von der Menge an intakten Virionen bestimmt wird, da nur virale Nukleinsäure innerhalb von Kapsiden vor der Enzymeinwirkung geschützt ist (Rosseel *et al.*, 2012). Im



Rahmen der rPCR sind Angaben wie  $10^6$  Virionen/ml Serum oder  $10^5$  Virionen insgesamt (Allander *et al.*, 2005) und 100 fg restriktionsgeschnittene genomische DNA (Stang *et al.*, 2005) oder Plasmid-DNA (Clem *et al.*, 2007) genannt, mit denen die Erzeugung noch nachweisbarer PCR-Produkte möglich war. Im Gegensatz dazu geben Clem *et al.* (2007) eine höhere Sensitivität an ( $10^3$  Genomequivalente /ml).

Dabei beziehen sich genannte Werte mit einer Ausnahme auf zellarme Probenmaterialien bzw. Materialien mit mäßigem Zellgehalt. Rosseel *et al.* (2012) verwendeten Gewebe, nutzten jedoch die sensitivere (Victoria *et al.*, 2009) *next-generation*-Sequenzierung. Andere Arbeiten, die Gewebe verwendeten, enthalten sich jeglicher Sensitivitätsangaben (Victoria *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2011).

Ein Vergleich mit den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit ist aufgrund der hier stattgefundenen relativen Quantifizierung zueinander über Ermittlung des Ct-Werts nur schwer möglich. Selbst in der Literatur sind Angaben untereinander nur bedingt vergleichbar. Die Angabe in Genomkopien oder Genomequivalenten darf nicht mit Virionen- oder Partikelzahlen gleichgesetzt werden. Weiterhin wurden massenbezogene Angaben gemacht, die oft mit nichtviralem Material und in Abwesenheit von Fremd-Nukleinsäure ermittelt wurden. Allander *et al.* (2005) sprechen von der Schwierigkeit eine absolute minimale Detektionsschwelle zu finden, da die Wahrscheinlichkeit der Detektion vielmehr eine Funktion aus Virustiter und Anzahl an analysierten Klonen darstelle. Zusätzlich hänge die Sensitivität von den Eigenschaften der jeweiligen Probe und den physikalischen und genetischen Eigenschaften des fraglichen Virus ab.

Es kann jedoch zusammenfassend für die hier durchgeführte rPCR und SISPA festgestellt werden, dass ein Versuch des Virusnachweises mit Material, das einen hohen, mäßigen und geringen Gehalt an EHV-1 aufwies, nur mit dem stark EHV-1-haltigen Material gelang. Dies bezieht sich jeweils auf die Analyse einer begrenzten Anzahl an Klonen (ca. zehn pro Probenmaterial). Eine Erhöhung dieser Anzahl auf das ca. Vierfache bei mäßigem EHV-1-Gehalt (Gehirngewebe) führte zu keinem Nachweis. Weiterhin erbrachte die Testung des wenig EHV-1-DNA enthaltenden Probenmaterials (Liquor) trotz des zellarmen Charakters keinen Virusnachweis.

### **3. Kontaminationsanfälligkeit**

Eine Kontamination kann untersucherassoziiert oder systembasiert auftreten und

beispielsweise bei der Probennahme, während der Laborarbeit oder durch verunreinigte Reagenzien stattfinden und in der Folge zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Schmidt *et al.*, 1991; Klaschik *et al.*, 2002; Rosseel *et al.*, 2014).

Um die auffällig hohe Zahl von *E. coli*-Sequenzen in den *random*-PCR-Ansätzen abzuklären, erfolgte eine Kontrolle aller verwendeten Reagenzien auf potentielle Kontaminationen (vgl. V.4.4.5.). Es konnten PCR-Produkte in allen getesteten Ansätzen festgestellt werden, was auf eine vorliegende Kontamination hindeutete. Aufgrund der Verwendung neuer Primer, die mit sterilem kommerziellen Wasser angesetzt worden waren, fiel der Verdacht auf eine Kontamination der fertigen Polymerase-Nukleotid-Mischung des *ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich). Die darin enthaltene *Taq*-Polymerase wird in *E. coli*-Bakterien hergestellt (Lawyer *et al.*, 1989). Die Kontaminationsproblematik, die daraus hervorgehen kann, wurde beschrieben (Tondeur *et al.*, 2004). Es ist daher anzunehmen, dass minimale Restkontaminationen systembasiert, d. h. durch die unspezifischen *random*-Primer amplifiziert wurden. Dies fand jedoch ohne eine Beeinträchtigung der anderweitig durchgeführten spezifischen PCRs oder der SISPA statt. Für das SISPA-Protokoll wurde bei den Probenmaterialien Liquor, Leber und Gehirn ebenfalls das *ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich) verwendet und keine *E. coli*-assoziierten Homologien beobachtet. Für ZKÜ und Zellen wurden das *TopTaq™ Master Mix Kit* (Qiagen) verwendet. Bei der Anwendung der SISPA-Methode wird nur DNA mit endständigen Adaptern amplifiziert. Da die Ligation der Adapter vor Hinzugeben des Mastermixes stattfand und somit *E. coli*-Fragmente erst nachträglich hinzukommen konnten, wurden diese trotz ihrer Anwesenheit nicht amplifiziert.

Für die Durchführung des rPCR-Protokolls mit EHV-1-haltigem Gehirnmaterial wurde das *TopTaq™ Master Mix Kit* (Qiagen) verwendet. Die BLAST-Analyse der daraus entstandenen PCR-Produkte führte nach deren Klonierung zu keinen Sequenzhomologien mit *E. coli*. Dies spricht dafür, dass in diesem Kit *E. coli*-Restkontaminationen in einer für die Methode relevanten Menge nicht anwesend sind. Allander *et al.* (2001) nennen als Ursprung für den Großteil der nichtviralen Sequenzen aus der DNase-SISPA-Methode den Wirt oder Bakterien, wobei die Hauptquelle Bakterien aus den verwendeten Reagenzien darstellten. Sie führen weiterhin aus, dass Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie DNA aus Bakterien enthalten würden, in denen sie produziert worden sind. In ihrem Fall

schiene die Reagenzien für die cDNA-Synthese kontaminiert zu sein.

Diese Art von Kontaminationsproblem konnte bei der SISPA in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Es verdeutlicht trotz alledem die Problematik der Kontamination in kommerziell erhältlichen Reagenzien und Enzymen, die unspezifische Methoden besonders betreffen (Muhl *et al.*, 2010). Es können allerdings auch spezifische Systeme beeinträchtigt werden (Corless *et al.*, 2000). Weiterhin existieren einige Berichte über das Vorliegen von Kontaminationen mit viralen Nukleinsäuren in kommerziell erhältlichen Kits, die während der Durchführung metagenomischer Studien entdeckt wurden (Lysholm *et al.*, 2012; Naccache *et al.*, 2013; Naccache *et al.*, 2014; Rosseel *et al.*, 2014; Smuts *et al.*, 2014). Von UV-Behandlungen, DNase- oder Restriktionsenzymverdau-Ansätzen zur Dekontamination wird in diesem Zusammenhang berichtet (Mennerat und Sheldon, 2014). Auch Stang *et al.* (2005) verwendeten UV-behandeltes Wasser und DNase-verdaute PCR-Reagenzien.

Bezüglich der im Rahmen der *random*-PCR beobachteten, systembasierten Kontaminationsproblematik können der Literatur keine derartigen Informationen entnommen werden. Bei Clem *et al.* (2007) sind lediglich Hinweise darauf zu finden. So nennen die Autoren eine minimale Anwesenheit von Amplifikaten in ihrer Negativkontrolle (nichtinokuliertes Plasma), die auch klonier- und sequenzierbar waren. Es handelte sich dabei zahlenmäßig um sieben Sequenzen, wobei sie für das relevante Virus insgesamt zwölf Klone, also nicht sehr viel mehr als mit der Negativkontrolle, produzieren konnten. Weiterhin wird von der Intention berichtet, die Methode hinsichtlich der Verringerung der stattgefundenen Hintergrundamplifikation zu verbessern, um weniger falsch positive Ergebnisse zu erzielen.

#### **4. Probenmaterialien**

Gesetztes Ziel in dieser Arbeit war die Testung verschiedenartiger Probenotypen mit ansteigendem Zellgehalt. Die weitaus am häufigsten verwendeten Materialien der SISPA, die in der Literatur genannt werden, sind praktisch zellfreie Flüssigkeiten wie ZKÜ, Serum bzw. Plasma (Reyes und Kim, 1991; Allander *et al.*, 2001; Kirkland *et al.*, 2007; Djikeng *et al.*, 2008; Depew *et al.*, 2013) oder Medien mit mäßigem Zellgehalt wie Kotproben oder Vollblut (Breitbart und Rohwer, 2005; Djikeng *et al.*, 2008; Castrignano *et al.*, 2013). Sie wurden wegen

ihres niedrigeren Gehalts an Wirts-Nukleinsäure gegenüber Gewebeproben mit großen Mengen an Fremd-Nukleinsäure, die die Methodik negativ beeinflussen könnten, bevorzugt verwendet (Kirkland *et al.*, 2007; Daly *et al.*, 2011). Gleiches gilt auch für die *random*-PCR. Viele Autoren verwendeten zellärmeres Material (Allander *et al.*, 2005; Stang *et al.*, 2005; Allander *et al.*, 2007; Clem *et al.*, 2007; Kapoor *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2009; Lysholm *et al.*, 2012).

Victoria *et al.* (2008) untersuchten Muskel- und Gehirngewebe akut infizierter Versuchsmäuse mit der *random*-PCR. Zwar wurde die Methode ohne Testung der Sensitivität und ohne quantifizierende Angaben durchgeführt, jedoch nennen sie die Notwendigkeit einer hohen Viruslast für die erfolgreiche Durchführung der rPCR. Da in der vorliegenden Arbeit mit der rPCR-Methode lediglich je zehn Klone analysiert wurden, Victoria *et al.* aber pro Virus 42 – 108 Klone auswerteten, können die Ergebnisse in keinen direkten Vergleich zueinander gestellt werden, da die Wahrscheinlichkeit des Virusnachweises mit der Anzahl sequenzierter Klone steigt (Allander *et al.*, 2005). Nichtsdestotrotz befanden sich bei genannter Arbeit unter einer Gesamtzahl von 353 Klonen 153 Sequenzen, die Homologien zu viralen Sequenzen aufwiesen.

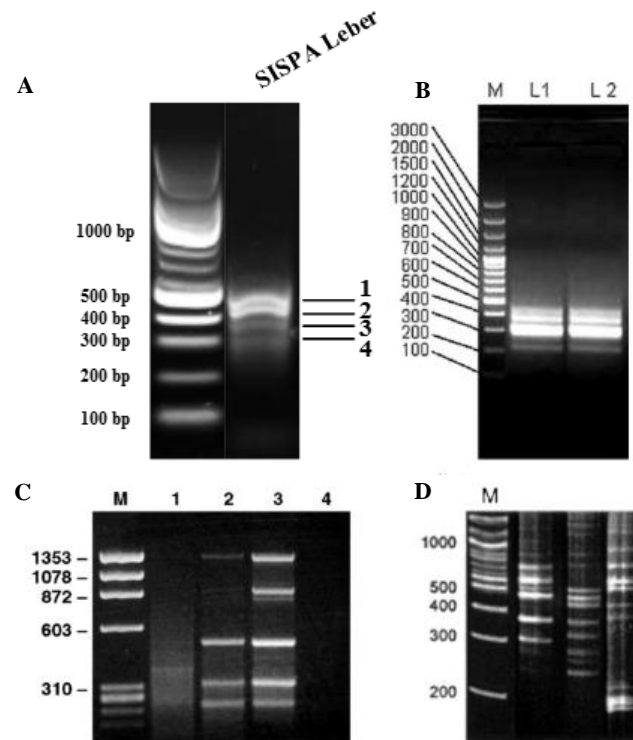
Rosseel *et al.* (2012) nutzten die DNase-SISPA-Methodik in Kombination mit NGS erfolgreich zum Nachweis des Schmallenberg-Virus (SBV) in Gehirnmaterial aus infizierten Gehirnproben nach dessen initialer Identifizierung durch Analyse metagenomischer *next-generation-sequencing*-Daten (Hoffmann *et al.*, 2012). Interessant dabei ist, dass das SBV-haltige Gehirnmaterial einen per *real time*-PCR ermittelten Ct-Wert von  $< 21$  (entspricht ca.  $10^{7,6}$  RNA-Kopien/ ml) aufwies, was die Autoren als stark virushaltig einstufen. Gleichzeitig führte die Verwendung von schwach virushaltigen Proben mit  $Ct > 28$  (entspricht  $10^{4,63}$  RNA-Kopien/ml) zu keinem Erfolg. Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Viruslast durch *real time*-PCR-Messung. Zwar können Ct-Werte aufgrund unterschiedlicher Viren und Geräte nicht direkt miteinander verglichen werden, jedoch kann man Parallelen hinsichtlich der Viruslast erkennen. Das in dieser Arbeit getestete EHV-1-haltige Lebergewebe war mit einem Ct-Wert von 19,68 stark virushaltig. Mit ihm konnte ein Virusnachweis getätigt werden. Das Gehirnmaterial mit mäßiger Viruslast (Ct 24,04) führte dagegen zu keinem Erfolg. Rai *et al.* (2011) nutzten die SISPA für den Nachweis des Bovinen Papillomavirus-10 (BPV-10) in Warzenmaterial. Dabei handelte es sich, wie in dieser Arbeit, um ein Virus mit einem doppelsträngigen DNA-

Genom, das nach vergleichbaren Anreicherungsschritten mit dem Adapter NBam24 ligiert, amplifiziert und kloniert wurde. Insgesamt wurden zwei Proben getestet, die im Agarosegel jeweils 3 – 4 Banden ergaben, pro Bande wurden 4 Klone mit der Sanger-Methode sequenziert. Auf die genaue Anzahl der Klone wird nicht eingegangen, aus den genannten Angaben kann man eine grob mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbare Zahl annehmen. Weiterhin ist die Vielfalt und Länge der PCR-Produkte vergleichbar mit denen aus dieser Arbeit. Dies steht im Gegensatz zu anderen Berichten (Allander *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005), in denen eine sehr viel größere Vielfalt an PCR-Produkten erzielt wurde (s. Abbildung 25).

Es ist fraglich, wie viele Banden jeweils tatsächlich dem gesuchten Virus zuzuordnen waren. Während Jones *et al.* für ca. die Hälfte der durch sie analysierten Klone eine nichtvirale Herkunft angeben, sind bei Allander *et al.* dazu keine Zahlen zu finden.

Rai *et al.* führten keine Quantifizierung der Viruslast durch. Es gibt jedoch Hinweise für das Vorliegen hoher Mengen an Virus in kutanen BPV-haltigen Warzen beim Wiederkäuer (Pangty *et al.*, 2010).

Die SISPA- und rPCR-Methode konnte in dieser Arbeit mit Gewebe trotz eines vielfach höheren Gehalts an Fremd-DNA bei einer ausreichend hohen Viruslast erfolgreich durchgeführt werden. Dabei war die Viruslast in den verwendeten zellärmeren Proben dieser Arbeit (ZKÜ und Zellsuspension mit Ct 19,97) vergleichbar mit der im Lebergewebe. Gardiner *et al.* (2012) geben für fetales EHV-1-haltiges Lebergewebe ebenfalls hohe Virusmengen an. Zum erfolgreichen Virusnachweis im zellreichen Gewebe war also nicht mehr Virus notwendig als im zellfreien bzw. zellarmen Material. Der Erfolg der SISPA und der rPCR scheint somit stark von der Viruslast im Probenmaterial abzuhängen. Dabei ist der negative Effekt ausgehend von zellulärer DNA offenbar nicht so stark wie allgemein vermutet. Zum Beleg dieses Sachverhalts ist jedoch eine quantifizierende Studie mit einem sehr viel höheren Probenaufkommen nötig.



**Abb. 25: PCR-Produkte bei der SISPA-Methode in dieser Arbeit (A) und in verschiedenen anderen Arbeiten (B-D)**

**A:** PCR-Produkte nach SISPA mit Lebergewebe in dieser Arbeit; **B:** PCR-Produkte nach SISPA mit Warzengewebe, L1 und L2 entsprechen den beiden getesteten Proben (Quelle: Rai *et al.*, 2011); **C:** PCR-Produkte nach SISPA mit Serum; Probe 3 entspricht der vollständig durchgeführten DNase-SISPA (Quelle: Allander *et al.*, 2001); **D:** PCR-Produkte nach SISPA mit Plasma, modifiziert nach Jones *et al.*, 2005  
M: molekulare Marker

## 5. Sequenzunabhängigkeit der Methoden

Die nachgewiesenen Genomabschnitte von EHV-1 und deren Längen unterschieden sich bei der SISPA und rPCR.

Die Insertionen der Klone aus der SISPA-Methode mit Übereinstimmungen zu EHV-1 beschrieben insgesamt 18 verschiedene Genomlokalisationen. Dabei entsprach meist ein Fragment einem ORF. Daraus ist zu schließen, dass durch die SISPA unterschiedliche Fragmente des in den Proben vorhandenen EHV-1-Genoms amplifiziert wurden.

In Fällen, in denen untersuchte DNA-Fragmente aus derselben Gelbande isoliert worden waren, wurden oft Übereinstimmungen zum selben ORF gefunden. Diese Tatsache war zu erwarten, da dasselbe PCR-Produkt durch die üblicherweise in einer PCR stattfindende exponentielle Amplifikation in vielen Kopien vorliegen

würde (Mullis, 1990b). In manchen Fällen konnten jedoch auch aus einer Bande unterschiedliche DNA-Fragmente mit demnach unterschiedlichen Homologien zu EHV-1-ORFs nachgewiesen werden. Dies rechtfertigte wiederum den Klonierungsschritt, der Fragmente derselben Größe aber unterschiedlicher Natur vor deren Sequenzierung vereinzeln sollte (Ambrose und Clewley, 2006).

Diese Ergebnisse unterstreichen das Prinzip der Amplifikation viraler DNA unabhängig von deren Sequenz, d. h. die Sequenzunabhängigkeit der SISPA-Methode (Reyes und Kim, 1991; Allander *et al.*, 2001).

Die im Vergleich dazu geringere Zahl an Sequenzhomologien, die durch die Klone der rPCR-Methode erreicht wurden, bezog sich nur auf zwei verschiedene Lokalisationen im EHV-1-Genom. Das Prinzip der Sequenzunabhängigkeit der rPCR konnte aufgrund dieser zahlenmäßigen Begrenzung bedingt durch die Kontaminationsproblematik nicht anschaulich belegt werden. Die festgestellten unterschiedlichen Fragmentlängen sprechen ebenso wie das Kriterium der unterschiedlichen Genomlokalisierung für die sequenzunabhängige Natur beider Methoden (Stang *et al.*, 2005; Ambrose und Clewley, 2006; Clem *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Sequenzunabhängigkeit wurden beide Methoden zur Sequenzierung ganzer Genome verwendet (Djikeng *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2010; Depew *et al.*, 2013; Neill *et al.*, 2014). Es wird jedoch von einer gewissen Selektivität berichtet, die zur Überrepräsentation mancher viraler Sequenzen führt (Karlsson *et al.*, 2013; Rosseel *et al.*, 2013).

## **6. Schlussfolgerungen**

### **6.1. Bewertung der Probenmaterialien und der Tauglichkeit zum Nachweis unbekannter DNA-Viren**

Insgesamt wurden zur Evaluierung der SISPA und rPCR fünf verschiedene Probenmaterialien verwendet. Sie wurden nach dem Prinzip der abfallenden Virusmenge und ansteigenden Fremd-DNA-Menge ausgewählt und getestet, da speziell nach einer Diagnostikmethode gesucht wurde, die unabhängig von der Art der eingesetzten Probe zur Diagnostik unbekannter bzw. unvermuteter DNA-Viren verwendet werden kann. Die SISPA und rPCR wurden in der Literatur bisher weitgehend mit zellfreien bzw. zellarmen Materialien durchgeführt und bewertet. Man erwartete, dass mit zunehmender Fremd-DNA-Menge die relative

Virusanreicherung durch physikalische Abtrennung und enzymatische Spaltung ineffizienter werden würde, was wiederum die selektive Amplifikation und den Nachweis viraler Genomfragmente erschweren würde. Eine mit dem ansteigenden Gehalt an Fremd-DNA zunehmende Ineffizienz konnte in den hier beschriebenen Versuchen beobachtet werden.

Durch die Analyse einer minimalen Anzahl an Klonen (ca. zehn pro Probenmaterial) wurde aber gezeigt, dass der Nachweis des EHV-1-Virus sowohl mit zellfreien, zellarmen und zellreichen Proben möglich war. Ein erfolgreicher Nachweis schien dabei mehr von einer ausreichend hohen Viruslast als vom Gehalt an Fremd-DNA im Ausgangsmaterial abhängig zu sein, obwohl dieser die Wirksamkeit der enzymatischen Spaltung von Fremd-DNA beeinträchtigte. Zum Nachweis musste die Virusmenge dabei im zellreichen Gewebe nicht höher sein als in zellfreien bzw. -armen Medien.

Eine grundlegende Voraussetzung für den Erfolg beider Methoden ist die Existenz schützender Viruskapside, also die Anwesenheit von Virionen, wie es typischerweise bei einer akuten Infektion der Fall ist (Allander *et al.*, 2001; Stang *et al.*, 2005; Clem *et al.*, 2007). Aus den Ergebnissen beider Methoden lässt sich weiterhin schließen, dass die Viruslast im Ausgangsmaterial hoch sein muss, um einen erfolgreichen Virusnachweis sowohl durch die SISPA als auch durch die rPCR mit einer minimalen Anzahl an zu sequenzierenden Klonen zu erreichen und damit eine in einem durchschnittlichen Diagnostiklabor durchführbare Methode zur Hand zu haben. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur. Generell ist die sorgfältige und gezielte Auswahl frischer Proben bei jeder Methode, die der Virusaufdeckung dienen soll, entscheidend für ihren Erfolg (Rosseel *et al.*, 2014).

Durch einen Vergleich der Ergebnisse beider getesteter Methoden konnte kein qualitativer Unterschied zwischen der SISPA und der rPCR festgestellt werden.

Eine saubere Arbeitsweise ist generell und speziell bei sequenzunabhängigen Methoden wie der SISPA und rPCR einzuhalten, um den Eintrag von Kontaminationen so gering wie möglich zu halten. Weiterhin ist die Prüfung kommerzieller Reagenzien vor allem bei widersprüchlichen Ergebnissen essentiell, da darin Spuren von Bakterien, die zur Herstellung der Reagenzien verwendet wurden, enthalten sein können (Mennerat und Sheldon, 2014). In dieser Arbeit ist dies lediglich bei der rPCR zum Tragen gekommen, deren Ergebnisse durch eine Amplifikation von *E. coli*-Kontaminationen aus der



verwendeten PCR-Polymerase stark beeinflusst wurden. Die SISPA wurde von dieser Kontamination nicht beeinträchtigt, jedoch ist auch diese Methode für Kontaminationen sehr anfällig.

Zusammenfassend war der Nachweis des EHV-1-Virus nach Anreicherung und Amplifikation für unterschiedliche Probenotypen sowohl durch die SISPA als auch durch die *random*-PCR ohne nötiges Wissen über eine Sequenz möglich. Einschränkungen bestanden bezüglich der Notwendigkeit einer hohen Virusmenge. Weiterhin erfordern beide Methoden die Anwesenheit von Virionen und sind somit auf die Diagnostik akuter Infektionen beschränkt. Latente Infektionen können aufgrund der intrazellulär vorliegenden Nukleinsäure, die nicht von Kapsid oder Hülle umgeben ist, durch die beiden getesteten Methoden nicht aufgedeckt werden (Rosseel *et al.*, 2013).

## 6.2. Erfüllung der Kriterien an eine Diagnostikmethode und die Tauglichkeit für den Diagnostikeinsatz

Beide Methoden wurden vergleichend zueinander durchgeführt. Sie wurden auf Basis der in Tabelle 34 genannten Anforderungen ausgewählt, die von beiden Methoden aufgrund der Ähnlichkeit im Ablauf entsprechend gut erfüllt wurden.

**Tab. 34: Erfüllung der geforderten Kriterien an eine Diagnostikmethode durch SISPA und *random*-PCR**

Kriterien	SISPA	<i>random</i> -PCR
Geräte vorhanden	✓	✓
Reagenzien größtenteils vorhanden	✓	✓
Kein Spezialwissen	✓	✓
Niedrige Kosten	✓	✓
Zeitaufwand	4 Tage + Sequenzierung	4 Tage + Sequenzierung
Einfachheit der Methode	✓	✓
Reproduzierbarkeit	✓	✓
Anwendbarkeit für verschiedene Probenmaterialien	✓	✓

Beide Methoden erzielten qualitativ vergleichbare Ergebnisse. Quantitative Aussagen lässt der Rahmen dieser Arbeit nicht zu.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind beide Methoden in der ausgeführten Version für den Einsatz in der Routinediagnostik jedoch nicht geeignet. Auch war der Fokus

dieser Arbeit lediglich auf die Diagnostik doppelsträngiger DNA-Viren ausgerichtet. Dies geschah mit der Intention, die grundsätzliche Durchführbarkeit beider Methoden zu testen. Aus dieser Motivation heraus schien es zweckmäßig sich auf eine Art von Virus zu beschränken. Dafür fiel die Wahl auf die Gruppe doppelsträngiger DNA-Viren, wodurch die Schritte der Zweitstrangsynthese und reversen Transkription vernachlässigbar waren. Durch diese Einschränkung wurde die Methodik weitgehend vereinfacht. Die Suche unbekannter oder unvermuteter Viren in Probenmaterial sollte jedoch sowohl DNA- als auch RNA-Viren in einzel- und doppelsträngiger Form erfassen können (Clem *et al.*, 2007; Djikeng *et al.*, 2008; Rosseel *et al.*, 2014). Dies bedeutet, dass für eine allgemeine Virussuche die Schritte der Zweitstrangsynthese und reversen Transkription ins Protokoll aufgenommen werden müssen. Hierzu kann der zusätzliche Einsatz von RNasen sinnvoll sein (Depew *et al.*, 2013; Neill *et al.*, 2014). Vorversuche lassen jedoch auf eine erhebliche Einschränkung der Effizienz beider Methoden durch die cDNA-Synthese schließen (Clem *et al.*, 2007). Somit stellt diese Arbeit ein Grundgerüst für beide Methoden dar, das noch weiterer Verfeinerung bedarf, um für die Diagnostik von RNA-Viren zweckmäßig zu sein.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Identifizierung unbekannter oder unvermuteter Viren in Probenmaterial stellt eine Herausforderung im Diagnostikalltag dar. Sequenzunabhängige molekulare Methoden können eine Ergänzung zu konventionellen Techniken bieten. Ziele dieser Arbeit waren die vergleichende Prüfung der *sequence-independent single primer amplification* (SISPA) und *random-PCR* als Vertreter sequenzunabhängiger Methoden zum Nachweis doppelsträngiger DNA-Viren und die Evaluierung ihrer Tauglichkeit als universell einsetzbare, schnelle, einfache und kostengünstige Alternativen für die Routinediagnostik. Als Modell diente das Equine Herpesvirus-1 (EHV-1), das in verschiedenen Probenmaterialien in absteigender Konzentration bei ansteigendem Fremd-DNA-Gehalt vorlag. Durch Schritte zur physikalischen und enzymatischen Virusanreicherung, sequenzunabhängigen Amplifikation in Kombination mit der konventionellen Sanger-Sequenzierung und einem Datenbankabgleich sollte EHV-1 wiedergefunden werden. Trotz variabler Inhibition durch Gewebekomponenten stellte sich die Enzymbehandlung unter Einsatz einer geeigneten DNase als effektive Methode zur Elimination von Fremd-DNA heraus. Die Protektion viraler Nukleinsäuren durch Viruskapsid bzw. -hülle, die die Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung darstellte, konnte in verschiedenen Materialien gezeigt werden. Weiterhin wurde ein gradueller Verlust an viraler DNA im Verlauf beider Methoden festgestellt, der eine hohe Viruslast im Ausgangsmaterial nötig macht. Sowohl die SISPA als auch die *random-PCR* führten zu einem vergleichbaren Erfolg beim Virusnachweis in Zellkulturüberstand, infizierten Zellen und Lebergewebe, was für ihre Anwendbarkeit in zellarmen wie auch in zellreichen Proben spricht. Der entscheidende Faktor für den Erfolg beider Methoden schien dabei vor allem die Viruslast zu sein. Ein hoher Zellgehalt in der Probe beeinflusste die Methodik hingegen offenbar weniger stark. Der nachgewiesene sequenzunabhängige Charakter stellte aufgrund einer damit einhergehenden erhöhten Kontaminationsanfälligkeit einen Schwachpunkt in der Methodik der *random-PCR* dar. In dieser Arbeit ist es gelungen, SISPA und *random-PCR* erfolgreich zum Nachweis doppelsträngiger DNA-Viren in Gewebe anzuwenden. Für die universelle Einsetzbarkeit zur Diagnostik unbekannter bzw. unvermuteter Viren sollten als nächstes geeignete Schritte der reversen Transkription und Zweitstrangsynthese erprobt werden.

## VIII. SUMMARY

The discovery of unknown or unsuspected viruses poses a major diagnostic challenge. Sequence independent molecular strategies can be of great value in addition to conventional methods. The goals of this study were to compare two sequence independent methods, namely sequence-independent single primer amplification (SISPA) and random-PCR, for the detection of double-stranded DNA viruses and to evaluate their application in routine diagnostics as universal, fast, simple and inexpensive means of detection. This was tested on decreasing concentrations of equine herpes virus-1 (EHV-1), the virus being present in different types of samples displaying increasing amounts of DNA derived from both host and bacteria. The aim was to recover EHV-1 after physical and enzymatic steps for viral enrichment, sequence-independent amplification, conventional Sanger sequencing and database homology search.

Despite variable tissue related inhibitory effects the enzymatic DNase treatment proved effective in eliminating non-viral DNA. The protection of viral nucleic acids by its capsid and envelope being a prerequisite for the successful application of both methods could be demonstrated in different types of samples. In the course of working with both methods a gradual loss of DNA was observed, thus requiring a high viral load in the original source. The recovery of virus in cell culture supernatant, infected cells as well as in liver tissue could be performed correspondingly by both SISPA and random-PCR methods. This indicates the general applicability in samples showing low and high levels of non-viral DNA. The viral load of the initial sample seemed to be the key factor for the successful application of both methods. In contrast to this, the amount of non-viral DNA apparently affected the methodology to a much lower extent than expected. In addition, the sequence-independent nature could be reproduced. However, this quality was associated with an increased susceptibility to contamination in case of the random-PCR method, which is a distinct limitation of this type of approach.

This work demonstrates the successful application of SISPA and random-PCR for the detection of double-stranded DNA viruses in tissue samples. Further work should focus on appropriate steps for reverse transcription and second strand synthesis in order to provide a general tool for the detection of unknown or unsuspected viruses.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

**Acinas SG**, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, Polz MF. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8966-9.

**Agnihothram S**, Gopal R, Yount BL, Jr., Donaldson EF, Menachery VD, Graham RL, Scobey TD, Gralinski LE, Denison MR, Zambon M, Baric RS. Evaluation of serologic and antigenic relationships between middle eastern respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses to develop vaccine platforms for the rapid response to emerging coronaviruses. *J Infect Dis* 2014; 209: 995-1006.

**Akowitz A**, Manuelidis L. A novel cDNA/PCR strategy for efficient cloning of small amounts of undefined RNA. *Gene* 1989; 81: 295-306.

**Allan BF**, Keesing F, Ostfeld RS. Effect of Forest Fragmentation on Lyme Disease Risk. *Conservation Biology* 2003; 17: 267-72.

**Allander T**, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11609-14.

**Allander T**, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12891-6.

**Allander T**, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007; 81: 4130-6.

**Altschul SF**, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.

**Ambrose HE**, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol* 2006; 16: 365-83.

**American Veterinary Medical Association** (2008) One Health: A New Professional Imperative. In: One Health Initiative Task Force: Final Report. American Veterinary Medical Association, Schaumburg. 13 - 7

**Anthony SJ**, Epstein JH, Murray KA, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrel CM, Solovyov A, Ojeda-Flores R, Arrigo NC, Islam A, Ali Khan S, Hosseini P, Bogich TL, Olival KJ, Sanchez-Leon MD, Karesh WB, Goldstein T, Luby SP, Morse SS, Mazet JA, Daszak P, Lipkin WI. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio* 2013; 4: e00598-13.

**Anyamba A**, Chretien JP, Small J, Tucker CJ, Formenty PB, Richardson JH, Britch SC, Schnabel DC, Erickson RL, Linthicum KJ. Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 955-9.

**Baker M**. Next-generation sequencing: adjusting to data overload. *Nat Meth* 2010; 7: 495-9.

**Barzon L**, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palu G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol* 2013; 58: 346-50.

**Benson** DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D36-42.

**Bernstein** FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Jr., Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* 1977; 112: 535-42.

**Bexfield** N, Kellam P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet J* 2011; 190: 191-8.

**Bhatt** S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496: 504-7.

**Biagini** P, Uch R, Belhouchet M, Attoui H, Cantaloube JF, Brisbarre N, de Micco P. Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* 2007; 88: 2696-701.

**Bloom** JD, Gong LI, Baltimore D. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* 2010; 328: 1272-5.

**Bodewes** R, Ruiz-Gonzalez A, Schapendonk CM, van den Brand JM, Osterhaus AD, Smits SL. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virol J* 2014; 11: 89.

**Boriskin** YS, Rice PS, Stabler RA, Hinds J, Al-Ghusein H, Vass K, Butcher PD. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5811-8.

**Breitbart** M, Rohwer F. Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. *Biotechniques* 2005; 39: 729-36.

**Briese** T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, Kapoor V, Casas I, Pozo F, Limberger R, Perez-Brena P, Ju J, Lipkin WI. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 310-3.

**Brueggemann** H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, Hujer S, Durre P, Gottschalk G. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 2004; 305: 671-3.

**Buckingham** L. DNA Sequencing. In: *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*, 1edn. Buckingham L, Flaws ML, eds. Philadelphia: F.A. Davis Company 2007: 203-24.

**Calisher** CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 531-45.

**Capobianchi** MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 15-22.

**Carey** MF, Peterson CL, Smale ST. DNase I footprinting. *Cold Spring Harb Protoc* 2013; 2013: 469-78.

**Castrignano** SB, Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Brandao PE, Curti SP. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and

electron microscopy analysis. *Virus Res* 2013; 178: 364-73.

**Chan** JF, Chan KH, Choi GK, To KK, Tse H, Cai JP, Yeung ML, Cheng VC, Chen H, Che XY, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Differential cell line susceptibility to the emerging novel human betacoronavirus 2c EMC/2012: implications for disease pathogenesis and clinical manifestation. *J Infect Dis* 2013; 207: 1743-52.

**Chang** Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266: 1865-9.

**Chaves** LF, Cohen JM, Pascual M, Wilson ML. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e176.

**Chen** EC, Miller SA, DeRisi JL, Chiu CY. Using a pan-viral microarray assay (Virochip) to screen clinical samples for viral pathogens. *J Vis Exp* 2011;

**Chiu** CY. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 468-78.

**Choo** QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.

**Chua** KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BW. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 2000; 288: 1432-5.

**Cleaveland** S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 2001; 356: 991-9.

**Clem** AL, Sims J, Telang S, Eaton JW, Chesney J. Virus detection and identification using random multiplex (RT)-PCR with 3'-locked random primers. *Virol J* 2007; 4: 65.

**Clewley** JP. A role for arrays in clinical virology: fact or fiction? *J Clin Virol* 2004; 29: 2-12.

**Cockerill** PN. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites. *Febs j* 2011; 278: 2182-210.

**Combe** M, Sanjuan R. Variation in RNA virus mutation rates across host cells. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003855.

**Connaghan-Jones** KD, Moody AD, Bain DL. Quantitative DNase footprint titration: a tool for analyzing the energetics of protein-DNA interactions. *Nat Protoc* 2008; 3: 900-14.

**Corless** CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1747-52.

**Corne** JM, Green S, Sanderson G, Caul EO, Johnston SL. A multiplex RT-PCR for the detection of parainfluenza viruses 1-3 in clinical samples. *J Virol Methods* 1999; 82: 9-18.

**Costard S**, Jones BA, Martinez-Lopez B, Mur L, de la Torre A, Martinez M, Sanchez-Vizcaino F, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU, Wieland B. Introduction of African swine fever into the European Union through illegal importation of pork and pork products. *PLoS One* 2013; 8: e61104.

**Cotmore SF**, Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science* 1984; 226: 1161-5.

**Daly GM**, Bexfield N, Heaney J, Stubbs S, Mayer AP, Palser A, Kellam P, Drou N, Caccamo M, Tiley L, Alexander GJ, Bernal W, Heeney JL. A viral discovery methodology for clinical biopsy samples utilising massively parallel next generation sequencing. *PLoS One* 2011; 6: e28879.

**Depew J**, Zhou B, McCorrison JM, Wentworth DE, Purushe J, Koroleva G, Fouts DE. Sequencing viral genomes from a single isolated plaque. *Virol J* 2013; 10: 181.

**Djikeng A**, Halpin R, Kuzmickas R, Depasse J, Feldblyum J, Sengamalay N, Afonso C, Zhang X, Anderson NG, Ghedin E, Spiro DJ. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 2008; 9: 5.

**Dominguez SR**, Briesse T, Palacios G, Hui J, Villari J, Kapoor V, Tokarz R, Glode MP, Anderson MS, Robinson CC, Holmes KV, Lipkin WI. Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade. *J Clin Virol* 2008; 43: 219-22.

**Drexler JF**, Corman VM, Muller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Cottontail VM, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, Knornschild M, Oppong S, Adu Sarkodie Y, Pongombo C, Lukashev AN, Schmidt-Chanasit J, Stocker A, Carneiro AJ, Erbar S, Maisner A, Fronhoffs F, Buettner R, Kalko EK, Kruppa T, Franke CR, Kallies R, Yandoko ER, Herrler G, Reusken C, Hassanin A, Kruger DH, Matthee S, Ulrich RG, Leroy EM, Drosten C. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 2012; 3: 796.

**Dunowska M**. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *N Z Vet J* 2014; 62: 179-88.

**Durand B**, Lecollinet S, Beck C, Martinez-Lopez B, Balenghien T, Chevalier V. Identification of hotspots in the European union for the introduction of four zoonotic arboviroses by live animal trade. *PLoS One* 2013; 8: e70000.

**Fan H**, Ye Y, Luo Y, Tong T, Yan G, Liao M. Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture reveals protein and pathway regulation in porcine circovirus type 2 infected PK-15 cells. *J Proteome Res* 2012; 11: 995-1008.

**FAO, OIE, WHO** (2010) The FAO-OIE-WHO Collaboration: Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces: A Tripartite Concept Note. FAO, Rome. 3

**Feng H**, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319: 1096-100.

**Finn RD**, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D222-30.

**Firth C**, Lipkin WI. The genomics of emerging pathogens. *Annu Rev Genomics Hum*



Genet 2013; 14: 281-300.

**Fischer** H, Scherz J, Szabo S, Mildner M, Benarafa C, Torriglia A, Tschachler E, Eckhart L. DNase 2 is the main DNA-degrading enzyme of the stratum corneum. PLoS One 2011; 6: e17581.

**Freifeld** CC, Mandl KD, Reis BY, Brownstein JS. HealthMap: Global Infectious Disease Monitoring through Automated Classification and Visualization of Internet Media Reports. Journal of the American Medical Informatics Association 2008; 15: 150-7.

**Froussard** P. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. Nucleic Acids Res 1992; 20: 2900.

**Froussard** P. rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences. PCR Methods Appl 1993; 2: 185-90.

**Fuller** CW, Middendorf LR, Benner SA, Church GM, Harris T, Huang X, Jovanovich SB, Nelson JR, Schloss JA, Schwartz DC, Vezenov DV. The challenges of sequencing by synthesis. Nat Biotechnol 2009; 27: 1013-23.

**Gardiner** DW, Lunn DP, Goehring LS, Chiang YW, Cook C, Osterrieder N, McCue P, Del Piero F, Hussey SB, Hussey GS. Strain impact on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion models: viral loads in fetal and placental tissues and foals. Vaccine 2012; 30: 6564-72.

**Gardner** SN, Jaing CJ, McLoughlin KS, Slezak TR. A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection. BMC Genomics 2010; 11: 668.

**Gatherer** D. The 2014 Ebola virus disease outbreak in West Africa. J Gen Virol 2014; 95: 1619-24.

**Ge** X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. J Virol 2012; 86: 4620-30.

**Gelderblom** HR, Hazelton PR. Specimen collection for electron microscopy. Emerg Infect Dis 2000; 6: 433-4.

**Gentile** M, Gelderblom HR. Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. New Microbiol 2005; 28: 1-12.

**Goldsmith** CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 552-63.

**Goldsmith** CS, Ksiazek TG, Rollin PE, Comer JA, Nicholson WL, Peret TC, Erdman DD, Bellini WJ, Harcourt BH, Rota PA, Bhatnagar J, Bowen MD, Erickson BR, McMullan LK, Nichol ST, Shieh WJ, Paddock CD, Zaki SR. Cell culture and electron microscopy for identifying viruses in diseases of unknown cause. Emerg Infect Dis 2013; 19: 886-91.

**Goodman** LB, Wagner B, Flaminio MJ, Sussman KH, Metzger SM, Holland R, Osterrieder N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). Vaccine 2006; 24: 3636-45.

**Greber** UF. Viral trafficking violations in axons: the herpesvirus case. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 5639-40.

**Greninger** AL, Chen EC, Sittler T, Scheinerman A, Roubinian N, Yu G, Kim E, Pillai DR, Guyard C, Mazzulli T, Isa P, Arias CF, Hackett J, Schochetman G, Miller S, Tang P, Chiu CY. A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America. *PLoS One* 2010; 5: e13381.

**Grothues** D, Cantor CR, Smith CL. PCR amplification of megabase DNA with tagged random primers (T-PCR). *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1321-2.

**Haible** D, Kober S, Jeske H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J Virol Methods* 2006; 135: 9-16.

**Hall** RJ, Wang J, Todd AK, Bissielo AB, Yen S, Strydom H, Moore NE, Ren X, Huang QS, Carter PE, Peacey M. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods* 2014; 195: 194-204.

**Hao** W, Bernard K, Patel N, Ulbrandt N, Feng H, Svabek C, Wilson S, Stracener C, Wang K, Suzich J, Blair W, Zhu Q. Infection and propagation of human rhinovirus C in human airway epithelial cells. *J Virol* 2012; 86: 13524-32.

**Hatta** M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001; 293: 1840-2.

**Hayden** EC. Technology: The \$1,000 genome. *Nature* 2014; 507: 294-5.

**Hazelton** PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 294-303.

**Heegaard** ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 485-505.

**Heid** CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-94.

**Hickman** D, Jones MK, Zhu S, Kirkpatrick E, Ostrov DA, Wang X, Ukhanova M, Sun Y, Mai V, Salemi M, Karst SM. The effect of malnutrition on norovirus infection. *MBio* 2014; 5: e01032-13.

**Hoffmann** B, Scheuch M, Hoper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 469-72.

**Hoffmann** M, Muller MA, Drexler JF, Glende J, Erdt M, Gutzkow T, Losemann C, Binger T, Deng H, Schwegmann-Wessels C, Esser KH, Drosten C, Herrler G. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One* 2013; 8: e72942.

**Hosseini** P, Sokolow SH, Vandegrift KJ, Kilpatrick AM, Daszak P. Predictive power of air travel and socio-economic data for early pandemic spread. *PLoS One* 2010; 5: e12763.

**Huang** Z, Tatem AJ. Global malaria connectivity through air travel. *Malar J* 2013; 12: 269.

**Huguenin** A, Moutte L, Renois F, Leveque N, Talmud D, Abely M, Nguyen Y, Carrat F, Andreoletti L. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol* 2012; 84: 979-85.

**Hunter** S, Corbett M, Denise H, Fraser M, Gonzalez-Beltran A, Hunter C, Jones P,

**Leinonen R**, McAnulla C, Maguire E, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Oisel A, Pesseat S, Radhakrishnan R, Rocca-Serra P, Scheremetjew M, Sterk P, Vaughan D, Cochrane G, Field D, Sansone SA. EBI metagenomics--a new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D600-6.

**International Human Genome Sequencing Consortium**. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45.

**Jahrling PB**, Geisbert TW, Dalgard DW, Johnson ED, Ksiazek TG, Hall WC, Peters CJ. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 1990; 335: 502-5.

**Jin L**, Lohr CV, Vanarsdall AL, Baker RJ, Moerdyk-Schauwecker M, Levine C, Gerlach RF, Cohen SA, Alvarado DE, Rohrmann GF. Characterization of a novel alphaherpesvirus associated with fatal infections of domestic rabbits. *Virology* 2008; 378: 13-20.

**Johne R**, Fernandez-de-Luco D, Hofle U, Muller H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *J Gen Virol* 2006; 87: 1189-95.

**Johnson DH**. Molecular cloning of DNA from specific chromosomal regions by microdissection and sequence-independent amplification of DNA. *Genomics* 1990; 6: 243-51.

**Johnson KM**, Lange JV, Webb PA, Murphy FA. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1977; 1: 569-71.

**Johnson M**, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuik Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: W5-9.

**Jones KE**, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-3.

**Jones KL**, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 2007a; 43: 675-81.

**Jones MS**, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 2005; 79: 8230-6.

**Jones MS**, Lukashov VV, Ganac RD, Schnurr DP. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2007b; 45: 2144-50.

**Jones MS**, 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 2007c; 81: 5978-84.

**Kaminuma E**, Kosuge T, Kodama Y, Aono H, Mashima J, Gojobori T, Sugawara H, Ogasawara O, Takagi T, Okubo K, Nakamura Y. DDBJ progress report. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D22-7.

**Kang LH**, Oh SH, Park JW, Won YJ, Ryu S, Paik SY. Simultaneous detection of waterborne viruses by multiplex real-time PCR. *J Microbiol* 2013; 51: 671-5.

**Kapoor A**, Victoria J, Simmonds P, Wang C, Shafer RW, Nims R, Nielsen O, Delwart E.

A highly divergent picornavirus in a marine mammal. *J Virol* 2008; 82: 311-20.

**Kapoor** A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Masroor Alam M, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A Newly Identified Bocavirus Species in Human Stool. *Journal of Infectious Diseases* 2009; 199: 196-200.

**Karlsson** OE, Belak S, Granberg F. The effect of preprocessing by sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) on metagenomic detection of viruses. *Biosecur Bioterror* 2013; 11 Suppl 1: S227-34.

**Kawane** K, Motani K, Nagata S. DNA degradation and its defects. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6

**Kellam** P. Molecular identification of novel viruses. *Trends Microbiol* 1998; 6: 160-5.

**Kirkland** PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 2007; 129: 26-34.

**Kistler** AL, Gancz A, Clubb S, Skewes-Cox P, Fischer K, Sorber K, Chiu CY, Lublin A, Mechani S, Farnoushi Y, Greninger A, Wen CC, Karlene SB, Ganem D, DeRisi JL. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol J* 2008; 5: 88.

**Klaschik** S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F. Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by real-time-PCR. *Mol Biotechnol* 2002; 22: 231-42.

**Klein** EY, Serohijos AW, Choi JM, Shakhnovich EI, Pekosz A. Influenza A H1N1 pandemic strain evolution--divergence and the potential for antigenic drift variants. *PLoS One* 2014; 9: e93632.

**Koboldt** DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013; 155: 27-38.

**Kohn** CW, Fenner WR. Equine herpes myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1987; 3: 405-19.

**Kolarevic** A, Yancheva D, Kocic G, Smelcerovic A. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014;

**Ksiazek** TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953-66.

**Kuiken** T, Leighton FA, Fouchier RAM, LeDuc JW, Peiris JSM, Schudel A, Stöhr K, Osterhaus ADME. Pathogen Surveillance in Animals. *Science* 2005; 309: 1680-1.

**Kurth** A, Kohl C, Brinkmann A, Ebinger A, Harper JA, Wang LF, Muhldorfer K, Wibbelt G. Novel paramyxoviruses in free-ranging European bats. *PLoS One* 2012; 7: e38688.

**Lambden** PR, Cooke SJ, Caul EO, Clarke IN. Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol* 1992; 66: 1817-22.

**Lander** ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.

**Landry** KS, Levin RE. Characterization of a Recently Purified Thermophilic DNase from a Novel Thermophilic Fungus. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 173: 1587-96.

**Lawyer** FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* 1989; 264: 6427-37.

**Leblanc** B, Moss T. DNase I footprinting. *Methods Mol Biol* 2009; 543: 37-47.

**Leinonen** R, Akhtar R, Birney E, Bower L, Cerdeno-Tarraga A, Cheng Y, Cleland I, Faruque N, Goodgame N, Gibson R, Hoad G, Jang M, Pakseresht N, Plaister S, Radhakrishnan R, Reddy K, Sobhany S, Ten Hoopen P, Vaughan R, Zalunin V, Cochrane G. The European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D28-31.

**Leroy** EM, Gonzalez JP, Baize S. Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 964-76.

**Li** L, Victoria J, Kapoor A, Blinkova O, Wang C, Babrzadeh F, Mason CJ, Pandey P,

Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser JM, Bartkus JM, Delwart EL. A novel picornavirus associated with gastroenteritis. *J Virol* 2009a; 83: 12002-6.

Li L, Barry P, Yeh E, Glaser C, Schnurr D, Delwart E. Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *J Gen Virol* 2009b; 90: 2413-7.

Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, Russell KL, Stenger DA. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 443-52.

Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M, Jr., Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SK, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-8.

Lipkin WI. Microbe hunting. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 363-77.

Lipkin WI. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 133-41.

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993; 259: 946-51.

Liu JK, Wei CH, Yang XY, Dai AL, Li XH. Multiplex PCR for the simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, classical swine fever virus, and porcine circovirus in pigs. *Mol Cell Probes* 2013; 27: 149-52.

Liu Q, Cao L, Zhu XQ. Major emerging and re-emerging zoonoses in China: a matter of global health and socioeconomic development for 1.3 billion. *Int J Infect Dis* 2014; 25c: 65-72.

Lohmann V, Bartenschlager R. On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *J Med Chem* 2014; 57: 1627-42.

Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner A, Fahlander K, Lindberg AM, Persson B, Allander T, Andersson B. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PLoS One* 2012; 7: e30875.

Ma G, Azab W, Osterrieder N. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Vet Microbiol* 2013; 167: 123-34.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-305.

Madoff LC. ProMED-mail: an early warning system for emerging diseases. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 227-32.

Mantero J, Belyaeva J, Linge JP (2011) How to maximise event-based surveillance web-systems: the example of ECDC/JRC collaboration to improve the performance of MedISys In: Scientific and Technical Research series. European Commission, Luxembourg: Publications Office of the European Union

Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 2011; 470:

198-203.

**Margulies** M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-80.

**Matsui** SM, Kim JP, Greenberg HB, Su W, Sun Q, Johnson PC, DuPont HL, Oshiro LS, Reyes GR. The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. *J Clin Invest* 1991; 87: 1456-61.

**Matsui** SM, Kim JP, Greenberg HB, Young LM, Smith LS, Lewis TL, Herrmann JE, Blacklow NR, Dupuis K, Reyes GR. Cloning and characterization of human astrovirus immunoreactive epitopes. *J Virol* 1993; 67: 1712-5.

**Maxam** AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 560-4.

**Mc Ginn** S, Gut IG. DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol* 2013; 30: 366-72.

**McGinnis** S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: W20-5.

**Mennerat** A, Sheldon BC. How to Deal with PCR Contamination in Molecular Microbial Ecology. *Microb Ecol* 2014;

**Mizuta** R, Araki S, Furukawa M, Furukawa Y, Ebara S, Shiokawa D, Hayashi K, Tanuma S, Kitamura D. DNase gamma is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* 2013; 8: e80223.

**Morey** M, Fernandez-Marmiesse A, Castineiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* 2013; 110: 3-24.

**Morse** SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 7-15.

**Morse** SS, Mazet JA, Woolhouse M, Parrish CR, Carroll D, Karesh WB, Zambrana-Torrel C, Lipkin WI, Daszak P. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet* 2012; 380: 1956-65.

**Muerhoff** AS, Leary TP, Desai SM, Mushahwar IK. Amplification and subtraction methods and their application to the discovery of novel human viruses. *J Med Virol* 1997; 53: 96-103.

**Muhl** H, Kochem AJ, Disque C, Sakka SG. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 41-9.

**Mullis** KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990a; 262: 56-

61, 4-5.

**Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990b; 48: 579-82.

**Mykhalovskiy E, Weir L.** The Global Public Health Intelligence Network and early warning outbreak detection: a Canadian contribution to global public health. *Can J Public Health* 2006; 97: 42-4.

**Naccache SN, Greninger AL, Lee D, Coffey LL, Phan T, Rein-Weston A, Aronsohn A, Hackett J, Jr., Delwart EL, Chiu CY.** The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns. *J Virol* 2013; 87: 11966-77.

**Naccache SN, Hackett J, Jr., Delwart EL, Chiu CY.** Concerns over the origin of NIH-CQV, a novel virus discovered in Chinese patients with seronegative hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E976.

**Nafz J, Schafer K, Chen SF, Bravo IG, Ibberson M, Nindl I, Stockfleth E, Rosl F.** A novel rodent papillomavirus isolated from anogenital lesions in its natural host. *Virology* 2008; 374: 186-97.

**Nan Y, Yu Y, Ma Z, Khattar SK, Fredericksen B, Zhang YJ.** Hepatitis E Virus Inhibits Type I Interferon Induction by ORF1 Product. *J Virol* 2014;

**Neill JD, Bayles DO, Ridpath JF.** Simultaneous rapid sequencing of multiple RNA virus genomes. *J Virol Methods* 2014; 201: 68-72.

**Ng TF, Manire C, Borrowman K, Langer T, Ehrhart L, Breitbart M.** Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics. *J Virol* 2009; 83: 2500-9.

**Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ.** Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993; 262: 914-7.

**Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S.** Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* 2005; 86: 1343-7.

**Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.** A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-7.

**Nunes MR, Palacios G, Faria NR, Sousa EC, Jr., Pantoja JA, Rodrigues SG, Carvalho VL, Medeiros DB, Savji N, Baele G, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF, Lipkin WI.** Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2769.

**OIE (2013)** Fact Sheets Wildlife Diseases. OIE, Paris

**OIE (2014)** Terrestrial Animal Health Code, 23 edn. OIE Paris

**Olival KJ, Islam A, Yu M, Anthony SJ, Epstein JH, Khan SA, Khan SU, Cramer G, Wang LF, Lipkin WI, Luby SP, Daszak P.** Ebola virus antibodies in fruit bats, bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 270-3.



**Oliveira L**, Alonso JC, Tavares P. A defined in vitro system for DNA packaging by the bacteriophage SPP1: insights into the headful packaging mechanism. *J Mol Biol* 2005; 353: 529-39.

**Palacios G**, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, Zhai J, Renwick N, Hui J, Hegyi H, Grolla A, Strong JE, Towner JS, Geisbert TW, Jahrling PB, Buchen-Osmond C, Ellerbrok H, Sanchez-Seco MP, Lussier Y, Formenty P, Nichol MS, Feldmann H, Briese T, Lipkin WI. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 73-81.

**Pandey V**, Nutter RC, Prediger E. Applied Biosystems SOLiD System: Ligation-Based Sequencing. In: *Next-Generation Genome Sequencing*, 1 edn. Janitz M, ed. Hoboken: Wiley-Blackwell 2008: 29 - 41.

**Pangty K**, Singh S, Goswami R, Saikumar G, Somvanshi R. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57: 185-96.

**Parrish CR**, Holmes EC, Morens DM, Park EC, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 457-70.

**Paz S**, Malkinson D, Green MS, Tsioni G, Papa A, Danis K, Sirbu A, Ceianu C, Katalin K, Ferenczi E, Zeller H, Semenza JC. Permissive summer temperatures of the 2010 European West Nile fever upsurge. *PLoS One* 2013; 8: e56398.

**Peiris JS**, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1319-25.

**Pereira-Lopes S**, Celhar T, Sans-Fons G, Serra M, Fairhurst AM, Lloberas J, Celada A. The exonuclease Trex1 restrains macrophage proinflammatory activation. *J Immunol* 2013; 191: 6128-35.

**Phongsisay V**, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 427-9.

**Prince WS**, Baker DL, Dodge AH, Ahmed AE, Chestnut RW, Sinicropi DV. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 289-96.

**Qiu X**. Heat induced capsid disassembly and DNA release of bacteriophage lambda. *PLoS One* 2012; 7: e39793.

**Rai GK**, Saxena M, Singh V, Somvanshi R, Sharma B. Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. *Vet Microbiol* 2011; 147: 416-9.

**Rector A**, Bossart GD, Ghim SJ, Sundberg JP, Jenson AB, Van Ranst M. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris* papillomavirus type 1. *J Virol* 2004a; 78: 12698-702.

**Rector A**, Tachezy R, Van Ranst M. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol* 2004b; 78: 4993-8.

**Rector A**, Tachezy R, Van Doorslaer K, MacNamara T, Burk RD, Sundberg JP, Van Ranst M. Isolation and cloning of a papillomavirus from a North American porcupine by using multiply primed rolling-circle amplification: the *Erethizon dorsatum* papillomavirus type 1. *Virology* 2005; 331: 449-56.

**Reyes GR**, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-9.

**Reyes GR**, Kim JP. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 473-81.

**Rocha-Pereira J**, Neyts J, Jochmans D. Norovirus: Targets and tools in antiviral drug discovery. *Biochem Pharmacol* 2014; 91: 1-11.

**Ronaghi M**, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 1996; 242: 84-9.

**Rosseel T**, Scheuch M, Hoper D, De Regge N, Caij AB, Vandenbussche F, Van Borm S. DNase SISPA-next generation sequencing confirms Schmallenberg virus in Belgian field samples and identifies genetic variation in Europe. *PLoS One* 2012; 7: e41967.

**Rosseel T**, Van Borm S, Vandenbussche F, Hoffmann B, van den Berg T, Beer M, Hoper D. The origin of biased sequence depth in sequence-independent nucleic acid amplification and optimization for efficient massive parallel sequencing. *PLoS One* 2013; 8: e76144.

**Rosseel T**, Pardon B, De Clercq K, Ozhelvaci O, Van Borm S. False-positive results in metagenomic virus discovery: a strong case for follow-up diagnosis. *Transbound Emerg Dis* 2014; 61: 293-9.

**Safar JG**, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 2005; 79: 10796-806.

**Sahin U**, Tureci O. Antigen identification using SEREX. *Methods Mol Biol* 2013; 1061: 59-77.

**Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-7.

**Sanghavi SK**, Bullotta A, Husain S, Rinaldo CR. Clinical evaluation of multiplex real-time PCR panels for rapid detection of respiratory viral infections. *J Med Virol* 2012; 84: 162-9.

**Scagliarini A**, Gallina L, Battilani M, Turrini F, Savini F, Lavazza A, Chiari M, Coradduzza E, Peli A, Erdelyi K, Alberti A. *Cervus elaphus* papillomavirus (CePV1): new insights on viral evolution in deer. *Vet Microbiol* 2013; 165: 252-9.

**Schmidt TM**, Pace B, Pace NR. Detection of DNA contamination in Taq polymerase. *Biotechniques* 1991; 11: 176-7.

**Scuda N**, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 2011; 85: 4586-90.

**Sharon I**, Banfield JF. Microbiology. Genomes from metagenomics. *Science* 2013; 342: 1057-8.

**Sheahan** T, Rockx B, Donaldson E, Sims A, Pickles R, Corti D, Baric R. Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium. *J Virol* 2008; 82: 2274-85.

**Sheridan** C. Illumina claims \$1,000 genome win. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 115.

**Shin** SY, Kim KS, Lee YS, Chung YS, Park KS, Cheon DS, Na BK, Kang Y, Cheong HM, Moon Y, Choi JH, Cho HE, Min NY, Son JS, Park YH, Jee Y, Yoon JD, Song CY, Lee KH. Identification of enteroviruses by using monoclonal antibodies against a putative common epitope. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3028-34.

**Simons** JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS, Erker JC, Buijk SL, Chalmers ML, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3401-5.

**Slonska** A, Cymerys J, Godlewski MM, Dzieciatkowski T, Tucholska A, Chmielewska A, Golke A, Banbura MW. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1)-induced rearrangements of actin filaments in productively infected primary murine neurons. *Arch Virol* 2014; 159: 1341-9.

**Smith** KM, Anthony SJ, Switzer WM, Epstein JH, Seimon T, Jia H, Sanchez MD, Huynh TT, Galland GG, Shapiro SE, Sleeman JM, McAloose D, Stuchin M, Amato G, Kolokotronis SO, Lipkin WI, Karesh WB, Daszak P, Marano N. Zoonotic viruses associated with illegally imported wildlife products. *PLoS One* 2012; 7: e29505.

**Smuts** H, Kew M, Khan A, Korsman S. Novel hybrid parvovirus-like virus, NIH-CQV/PHV, contaminants in silica column-based nucleic acid extraction kits. *J Virol* 2014; 88: 1398.

**Song** N, Jo H, Choi M, Kim JH, Seo HG, Cha SY, Seo K, Park C. Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis. *J Gen Virol* 2013; 94: 1587-96.

**Song** YJ, Park WJ, Park BJ, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee NH, Seo KH, Kang YS, Choi IS. Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin Exp Vaccine Res* 2014; 3: 29-36.

**Southern** EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.

**Southern** EM. DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* 1996; 12: 110-5.

**Stang** A, Korn K, Wildner O, Uberla K. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 716-20.

**Steinman** CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* 1975; 56: 512-5.

**Storch** GA. Diagnostic Virology. In: Fields Virology. 5 ed. Knipe DM, ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2007: 565 - 604.

**Stucker** KM, Pagan I, Cifuentes JO, Kaelber JT, Lillie TD, Hafenstein S, Holmes EC, Parrish CR. The role of evolutionary intermediates in the host adaptation of canine parvovirus. *J Virol* 2012; 86: 1514-21.

**Taheri** A, Robinson SJ, Parkin I, Gruber MY. Revised selection criteria for candidate

restriction enzymes in genome walking. *PLoS One* 2012; 7: e35117.

**Tamura K**, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-9.

**Tang P**, Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol* 2010; 5: 177-89.

**Tatusov RL**, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 41.

**Tatusova T**, Ciufo S, Fedorov B, O'Neill K, Tolstoy I. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D553-9.

**Taylor LH**, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 983-9.

**Thurber RV**, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat Protoc* 2009; 4: 470-83.

**Tondeur S**, Agbulut O, Menot ML, Larghero J, Paulin D, Menasche P, Samuel JL, Chomienne C, Cassinat B. Overcoming bacterial DNA contamination in real-time PCR and RT-PCR reactions for LacZ detection in cell therapy monitoring. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 437-41.

**Towner JS**, Amman BR, Sealy TK, Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PB, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD, Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimnedi P, Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol ST, Rollin PE. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000536.

**Tsetsarkin KA**, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 2007; 3: e201.

**UniProt Consortium**. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D191-8.

**United Nations**, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2012) World Urbanization Prospects: The 2011 Revision, CD-ROM Edition

**van der Hoek L**, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10: 368-73.

**van der Meijden E**, Wunderink HF, van der Blij-de Brouwer CS, Zaaijer HL, Rotmans JI, Bavinck JN, Feltkamp MC. Human polyomavirus 9 infection in kidney transplant patients. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 991-9.

**van der Meulen K**, Caij B, Pensaert M, Nauwynck H. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol* 2006; 113: 265-73.

**van Riel D**, Leijten LM, Verdijk RM, GeurtsvanKessel C, van der Vries E, van Rossum AM, Osterhaus AD, Kuiken T. Evidence for influenza virus CNS invasion along the olfactory route in an immunocompromised infant. *J Infect Dis* 2014; 210: 419-23.

**Venter JC**, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.

**Victoria JG**, Kapoor A, Dupuis K, Schnurr DP, Delwart EL. Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000163.

**Victoria JG**, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol* 2009; 83: 4642-51.

**Victoria JG**, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol* 2010; 84: 6033-40.

**Vos P**, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4407-14.

**Vreede FT**, Cloete M, Napier GB, van Dijk AA, Viljoen GJ. Sequence-independent

amplification and cloning of large dsRNA virus genome segments by poly(dA)-oligonucleotide ligation. *J Virol Methods* 1998; 72: 243-7.

**Wang D**, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15687-92.

**Wang D**, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, Mardis ER, Hickenbotham M, Magrini V, Eldred J, Latreille JP, Wilson RK, Ganem D, DeRisi JL. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003; 1: E2.

**Wendt A**, Kreienbrock L, Campe A. Zoonotic Disease Surveillance - Inventory of Systems Integrating Human and Animal Disease Information. *Zoonoses Public Health* 2014;

**Wetterstrand K**. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). Bethesda: National Human Genome Research Institute 2014; 18.07.2014: [www.genome.gov/sequencingcosts](http://www.genome.gov/sequencingcosts). 01.09.2014.

**Willner D**, Hugenholz P. From deep sequencing to viral tagging: recent advances in viral metagenomics. *Bioessays* 2013; 35: 436-42.

**Wolfe ND**, Switzer WM, Carr JK, Bhullar VB, Shanmugam V, Tamoufe U, Prosser AT, Torimiro JN, Wright A, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Heneine W. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* 2004; 363: 932-7.

**Woolhouse ME**, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1842-7.

**Woolhouse ME**, Howey R, Gaunt E, Reilly L, Chase-Topping M, Savill N. Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proc Biol Sci* 2008; 275: 2111-5.

**Yamada S**, Matsumura T, Tsujimura K, Yamaguchi T, Ohya K, Fukushi H. Comparison of the growth kinetics of neuropathogenic and nonneuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) strains in cultured murine neuronal cells and the relevance of the D/N(752) coding change in DNA polymerase gene (ORF30). *J Vet Med Sci* 2008; 70: 505-11.

**Yang JR**, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, Liu MT. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 76-82.

**Yuan L**, Li M, Li L, Monagin C, Chmura AA, Schneider BS, Epstein JH, Mei X, Shi Z, Daszak P, Chen J. Evidence for retrovirus and paramyxovirus infection of multiple bat species in china. *Viruses* 2014; 6: 2138-54.

**Zaichick SV**, Bohannon KP, Smith GA. Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections. *Viruses* 2011; 3: 941-81.

**Zavala AG**, Kulkarni AS, Fortunato EA. A dual color Southern blot to visualize two genomes or genic regions simultaneously. *J Virol Methods* 2014; 198: 64-8.

**Zhao W**, Li X, Liu WH, Zhao J, Jin YM, Sui TT. Construction of high-quality Caco-2 three-frame cDNA library and its application to yeast two-hybrid for the human astrovirus protein-protein interaction. *J Virol Methods* 2014; 205c: 104-9.

## X. ANHANG

### 1. Materiallisten

#### 1.1. Kommerzielle Chemikalien, Enzyme und Lösungen

**Tab. 35: Verwendete kommerzielle Chemikalien, Enzyme und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)	New England Biolabs (Schwalbach)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Bromophenolblau	Merck (Darmstadt)
Csp6.I	Thermo Fisher Scientific (UK)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, 96%	Roth (Karlsruhe)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000-fach in Wasser	Biotium (Köln)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin (10000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml in 0.9% NaCl)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Primer und Sonden	Sigma-Aldrich (München)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden)
SOC-Medium	New England Biolabs (Schwalbach)
SeaKem® LE Agarose	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, USA)
Sucrose	Merck (Darmstadt)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
Tris	Appli Chem (Darmstadt)
Turbo™ DNase	Ambion® Life Technologies Thermo Fisher Scientific (UK)

#### 1.2. Kommerzielle Kits

**Tab. 36: Verwendete kommerzielle Kits**

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega (Madison, USA)
QIAmp® DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect® Probe RT PCR Kit	Qiagen (Hilden)
ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TOPO TA Cloning® Kit For Sequencing	Thermo Scientific (UK)
TopTaq™ Master Mix Kit	Qiagen (Hilden)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Madison, USA)

### 1.3. Hergestellte Puffer und Lösungen

**Tab. 37: Verwendete Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel (1% und 1,5 %)	1g bzw. 1,5 g Agarose 100 ml 1 X TAE-Puffer 2,5 µl Gel Red
Ladepuffer (6X)	4 g Sucrose 25 mg Bromophenolblau mit A. demin auf 10 ml auffüllen
LB-Ampicillin-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt granuliert 5 g NaCl 1 Liter A. demin, auf pH 7,2 mit 1 N NaOH eingestellt 50 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin-Platten	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt granuliert 5 g NaCl, 12 g Bacto Agar 1 Liter A. demin, auf pH 7,2 mit 1 N NaOH eingestellt 50 µg/ml Ampicillin
NaCl-Lösung (5M)	5 M NaCl
TAE-Puffer (1X)	40mM Tris 20mM Essigsäure 1mM EDTA
TE-Puffer (1X)	10 mM Tris, pH 8 0,1 mM EDTA

### 1.4. Verbrauchsmaterial

**Tab. 38: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

Bezeichnung	Hersteller/ Bezugsquelle
Costar®-Spin-X®-Zentrifugen-Filtersysteme (2 ml)	Corning Inc. (Corning, USA)
Einmalhandschuhe, Nitril	UNIGLOVES® Arzt- und Klinikbedarf (Troisdorf)
Einmalskalpell, steril	Aesculap (Tuttlingen)
Entsorgungsbeutel	Carl Roth (Karlsruhe)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterspitzen (10 – 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Flächendesinfektionsmittel SafeSept	Henry Schein (Melville, USA)
Laborglaswaren	Schott Glas (Mainz)
Messpipetten aus Glas (1 ml, 5 ml, 10 ml)	Brand (Wertheim)
Optical Caps	Thermo Fisher Scientific (UK)
PCR-Tubes	Thermo Fisher Scientific (UK)
Pipettenspitzen (200µl, 1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
real time-PCR-Reaktionsgefäße	Thermo Fisher Scientific (UK)
Stahlkugeln, 5mm	Qiagen (Hilden)
Zellkulturflaschen (250 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)



## 1.5. Geräte und Software

**Tab. 39: Verwendete Geräte und Software**

Bezeichnung	Modell/ Typ	Hersteller/ Bezugsquelle
Analysenwaage	Typ 1216 MP Navigator™	Sartorius (Göttingen) Ohaus (Gießen)
BLAST-Software		National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA)
Brutschrank Chemilumineszenz- imager	Typ BVM 50 Chemidoc™ MP Imaging System mit ImageLab™ Software, Version 5.0 BIO View Transilluminator	Memmert (Schwabach) Bio-Rad (München) Biostep (Jahnsdorf)
Datenverarbeitungs- programme	Microsoft Office 2013	Microsoft (Redmond, USA)
Flockeneisbereiter	KF75	Migel (Mailand, It)
Gelelektrophorese- kammer	Mupid One	Advance (Düren)
Laborschwingmühle Mega6	MM300	Retsch (Haan)
Micropipetten (10 – 1000 µl)	Research plus	(Tamura <i>et al.</i> , 2013) Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler real time PCR-Cycler	peqSTAR 2X MxPro 3000P MxPro 3005P mit MxPro QPCR-Software	PEQLAB (Erlangen) Stratagene (La Jolla, USA) Stratagene (La Jolla, USA) Agilent Technologies (Böblingen)
pdf-Reader	Adobe-Reader 11	Adobe Systems (San Jose, USA)
pH-Meter	Piccolo plus	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 mit ND-1000 Software, Version 3.8.1	PEQLAB (Erlangen)
Thermoschüttler Vortex-Schüttler	Thermomixer comfort Vortex-Genie	Eppendorf (Hamburg) Bender & Hobein (Zürich, CH)
Wasserbad	Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifugen	Mikrozentrifuge 1-14 Tischzentrifuge 3-16 Centrifuge 54 17 R CAPSULE HF-120	Sigma (Osterode am Harz) Sigma (Osterode am Harz) Eppendorf (Hamburg) Tomy Seiko (Tokyo, J)

## 2. BLAST-Listen

### 2.1. SISPA

**Tab. 40: Ergebnisse der SISPA bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem Liquor**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
L1_T7	<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1, complete genome	69	95	351
L3_T7	<i>Sporobolomyces roseus</i> clone JGIBAIF-9L20, complete sequence	77	100	417
L4_T7	<i>Populus nigra</i> microsatellite DNA, clone WPMS12	81	15	378
L5_T7	<i>Rhodospiridium toruloides</i> strain CECT1137, genomic scaffold, scaffold RHTO0S03	70	39	414
L6_T7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome	82	19	268
L7_T7	<i>Rhodospiridium toruloides</i> strain CECT1137, genomic scaffold, scaffold RHTO0S03	83	39	271
L8_T7	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> clade IIA str. UW-1, complete genome	96	10	267
L9_T7	<i>Rahnella aquatilis</i> HX2, complete genome	68	84	305
L10_T7	<i>Rhodospiridium toruloides</i> strain CECT1137, genomic scaffold, scaffold RHTO0S13	82	99	193

**Tab. 41: Ergebnisse der SISPA bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem Gehirngewebe**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeck-rate (%)	Länge (bp)
G1_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19324	94	91	267
G2_T7	Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-454K7 of library RPCI-11 from chromosome 14 of <i>Homo sapiens</i> (Human), complete sequence	74	84	265
G3_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19301	89	98	310
G4_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19324	88	91	265
G5_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19276	87	92	295
G6_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19324	88	73	267
G7_T7	<i>Pan troglodytes</i> chromosome X BAC PTB-134F20, complete sequence	90	44	182
G8_T7	Pig DNA sequence from clone CH242-137L16 on chromosome X, complete sequence	82	52	272
G9_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19324	88	98	246
G10_T7	<i>Pan troglodytes</i> chromosome X clone PTB-121G7 map human ortholog p11.4, complete sequence	86	21	226
G1/1_T7	<i>Equus caballus</i> subtracted library fragment 89	87	60	646
G1/2_T7	PREDICTED: <i>Equus caballus</i> aldehyde oxidase 1 (AOX1), transcript variant X2, mRNA	100	37	560

G1/3_T7	<i>Equus caballus</i> mitochondrial DNA, complete genome, isolate: TH1	99	100	553
G2/1_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19301	98	69	483
G2/2_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite UM007 sequence	84	51	458
G2/3_T7	<i>Equus caballus</i> satellite DNA, chromosome 1 centromeric specific repeat, clone H12	86	19	512
G3/2_T7	<i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-36H20 from 7, complete sequence	79	85	263
G3/3_T7	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe19319	89	99	480
G3/4_T7	PREDICTED: <i>Bubalus bubalis</i> uncharacterized LOC102415540 (LOC102415540), transcript variant X2, misc_RNA	72	60	348
1a_T7	<i>Homo sapiens</i> chromosome 18, clone CTD-2302G2, complete sequence	84	99	664
1b_T7	Human DNA sequence from clone RP11-439F21 on chromosome 6, complete sequence	76	77	606
1c_T7	Pig DNA sequence from clone CH242-166I17 on chromosome X, complete sequence	72	98	638
1d_T7	PREDICTED: <i>Equus caballus</i> aldehyde oxidase 1 (AOX1), transcript variant X2, mRNA	100	37	560
1e_T7	<i>Homo sapiens</i> phospholipase C, epsilon 1 (PLCE1), RefSeqGene on chromosome 10	76	100	637
1f_T7	<i>Erwinia billingiae</i> strain Eb661 complete chromosome	70	94	690
1g_T7	<i>Homo sapiens</i> chromosome 4 clone B220G8 map 4q21, complete sequence	75	72	628
2a_T7	<i>Homo sapiens</i> 3 BAC RP11-517B11 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	80	77	512
2b_T7	<i>Homo sapiens</i> chromosome 5 clone CTD-2199L4, complete sequence	80	89	500
2c_T7	PREDICTED: <i>Equus caballus</i> E1A binding protein p400 (EP400), mRNA	81	73	484
2d_T7	<i>Equus caballus</i> satellite DNA, chromosome 1 centromeric specific repeat, clone H12	87	19	512
2e_T7	<i>Homo sapiens</i> 12 BAC RP11-897M7 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	75	68	467
2f_T7	Pig DNA sequence from clone CH242-498A9 on chromosome X, complete sequence	89	100	562
2g_T7	Pig gender-neutral repetitive DNA	78	98	486
3a_T7	<i>Homo sapiens</i> chromosome 8, clone RP11-249L4, complete sequence	78	96	382
3b_T7	<i>Homo sapiens</i> chromosome 18, clone RP11-685A21, complete sequence	74	76	431
3c_T7	<i>Equus caballus</i> clone 10_f01 rab GDP dissociation inhibitor beta-like protein (GDI2) mRNA, partial cds	100	37	323
3e_T7	<i>Homo sapiens</i> integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), RefSeqGene	70	14	335

3f_T7	on chromosome 10			
	Human DNA sequence from clone RP11-64P11 on chromosome 9, complete sequence	64	80	378

## 2.2. Random-PCR

**Tab. 42: Ergebnisse der random-PCR bei der Untersuchung von EHV-1-enthaltendem Gehirn**

Klon	bester Treffer	Identität (%)	Abdeckrate (%)	Länge (bp)
1a	<i>Niastella koreensis</i> GR20-10, complete genome	77	98	409
1b	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101, complete genome	88	10	307
1c	<i>Niastella koreensis</i> GR20-10, complete genome	77	98	409
2a	<i>PREDICTED: Bombus impatiens adenylosuccinate lyase-like (LOC100744099), mRNA</i>	82	19	270
2b	<i>Propionibacterium acnes hdn-1, complete genome</i>	100	100	223
2c	<i>Equus caballus</i> clone CH241-409I22, complete sequence	82	66	240
3a	<i>Serratia proteamaculans</i> 568, complete genome	88	99	493
3b	<i>Homo sapiens</i> 3 BAC RP11-711F20 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	83	94	447
4a	<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i> AHT2, complete genome	75	78	222
4b	<i>PREDICTED: Apis florea</i> ATP-binding cassette sub-family A member 2-like (LOC100867222), mRNA	74	52	377

## 3. Sequenzen der Klone mit Sequenzhomologien zu EHV-1

### 3.1. Sequenzen der SISPA-Methode

**Tab. 43: Sequenzen der EHV-1-haltige Klone aus der SISPA-Methode**

Klon	Sequenz	Quelle
1_T3	TACCCCTTGTCTGTCCTCACCACACCTGAGGGAACCCGGTGTCTATACAGGACT TTGCTTCTCCAAGTGAGAGGATGACCTCTTTACCCCCCATGAGAGAGGACAC GCGACTGGATCGTCTTACATTGGCGTCTCCACGGCGCTGCGATACTCAATG GCTTCCAGGTGAGGGCGGCTTCCCGCAGCGGCTATACCGGAATTTCTGGTA TTCGATATATATGCCTATTCTCATCCGACGGATGCTCATGCCCTCGCTCGGA TAACATCTGTGGCT	ZKÜ
2_T3	TACCTCGTGAGCAACTATTTGCCGTGCGGCTCACTGTCTTCCCGGCGCCTTG GGCCGGACGAGGAGCCCGACCAAAACCCTATTTGCGCACGTCTCCCTGTGCG TAATCGGCCGTAGAGTGGAACAATCGTCACTTACGACGCCACCCCGGAAA ATGCGGTGGCCCCCTTCAAGAGGCTGTCCCGTCCTACGCGAGGAATTGTT AATAACGGCAGCAAGGCACAATCGCGCTTGGGGGACGCGGCCACGTGGCA CCTATCAGAGGACACCCTGACCCGGGTCTTACTGTCAACCGCCGTTAACGGC GTGCTCTACGAAAACGCTGGAACCTGGAGGACCGACGACGGAGAGAGGG TGGCATAACG GGTACCCGTA	ZKÜ

3_T3	TACAATCGGGTTTCTCTTGTCTCTCTCGAATGGGCCTGTTGTGCACCAAAT GGCCGCCGGTGTTCCTCAAAGTTAACTTCGGCCATCTCCACCCAAGGAATGGC GGCGTAGTCCACCCCATCCACCCATAGCTCCTGAGCCCTGGCCCTGCCCATG TCGGCCCTGTGCAAAATCGGGTCGCAGTCCAGATGAGAGGCGGTAGCAGG GCCGATCGAGCAGCACATTGTTACGCGCTCGTGTCCCTGGCC	ZKÜ
1/1_T3	TAACCCCAACGCCTTTGTGTTTTATGGAGGCTCGGTATCGGAGCCAGCTCT AATGCCCCCAACCTCACCCGCGCTTGCGAGGCTGCGAGACGGAGGTTTGGC TTTTCTGCATTCTCTCGCCACCCGTTGAGAACGCCGTGGAAACCTCCGGGG AAGAAATATGCGCTTCTCTCAACCTGTCTCCGGAGACCACCGCGCTGTACCT GGTGGTAACCGAAAAGTTTCAAAGAGATGGTGTACGTGTGCAACACCTTCCT CCACTACGGCGGAACCAGCACAGTTACCATCGATGGACAAGATGCCATGAA GATTCCAATCTATCCGGTACAGCTGTATATGCCGGATGTCAACAGACTGGCG TCAGAGCCG TTTA	ZKÜ
1/2_T3	TAAAAGGGGTTAGCTGTCCGTATCTGGTGGGTGATGGGCGTATCTACTATGC TACGAACTGGGTTTATGCGTACTCTTCTGGGGAAGACGGTTGGTGTGCTG CTTGTGGGTGACCTTCCCATCGCATGCCCAACCATCCGCTACCGATTATTC TGGTTATATCCTCGTCTAGAGCCACCCGTTTCCATCCGGTTGTGTTGACAGG AATCGGCTGTCCGTGCGGCCCCGGTCCCCCTGATGGTGTTCCCCATGTTGAGT GTTATCTTGCGGCTGCACCTCATGCCCCCTGAACTTTCTCCCTCCGCCGCT CCATGGATGAAACTCGAAACATATTGACATCCCCCTCCACGGTTA	ZKÜ
1/3_T3	TAAACGTTTCCAGTTTTTGTGTCCCTCTGCAAACCTTTGATTCAATGGCTCCTA TAACTTTGGGGGGTAAGCGGCCATATTTGTTATCTGCTCGCATTTCAAAAAT GACCCCATCGACGCCTGGAGGGTGCCTGCCCTCTGATGGGCATCCACGAA CCCATCCATGGAAACATCAACTCGCGGAACGGCGCGGGAGAAATTCCCCC TGCTCGTCCCAGCTAACTTCTGTGCGCGTGAGCTGACGCCTCAGCTCGTCT AGTCCCCCGTAGTGTGTGTAGCTTCTCTATTGCTCGGCATACGGATCCA TCGGTCCCTTGCCGTCTATTTATTTAGGGGATGGGAATCAATAATGGA CCGCGCCT GCTGGAGCCACTCCACGGCCTTA	ZKÜ
2/2_T3	TAACGTCGCGCTTCTGATTGAGGACTGACGGATCGATGACCTTGCCCTCCGT GAAAATCTCGTTCTCTCTCCCATTGCGCCTTCTGTGACCCCTCTGTTGATTG CCTTCTTAATAACTGTTCTGTACGGGGGGGCTAAACATAACCGTGTTTTA GTGCTTCCACCTATTGGAGATTTGCCGTTCTCGTCTGCCTCTGTATGTACACA GTGATATTATTGACTCACCTCCCCACGAACGGCGATCCCCCTGGCCCGTGC ACGCTGCTGACACAAAAAGTCTCCCGTTAACTTTACCCGGTGGTGCATATC CTAGAGGAAAATTGGCGCATGATGACCACCGATATGCCCATAGTGCCGGTC ACTATT ATTCGGGAACAAGTGTTGATCTCATCCACCCCG	ZKÜ
1/1_T3	TACCCAACCTCGCAGTATCGCAGCGTGACGCCAGGGGGGCGAGCGGGGGAG ATGCTGCCGCTATGGTTAGTCGTAGCGGTAACAACGGCTTCACCTTTTTAAG CCACCGTTACATCTCCCCATATACATAGCCAACAGGGATGTGGAATTGACC CTACTGTTTCCCGGCCTGGCAGCCCTATGCTTAGACGCTCATACGGGGACTC GCGATCAGCCGCATCACCGCGCTGTTAACGTGTCAACCGGATCCAATCGGA CCAAGTTGACCAGCTGAATAAGCATATCTCTGGAGAATATACGCCGGACAG CCCCGTCCCAATAAACGATGTGCTTGGCGCACACGACACCGGACCCCTCC GGCAC	Zellen
1/1_T7	TACTGGAGGGCTACGGCGTCGTGCGCGGCAAGCACCTCGTTTATTGGGACG GGGCTGTCCGGCGTCTATTCTCCAGCTCTATGCCTATTAACCTGGTCAAGTG GTCTGATTGCGCCCGGTAGACACGTTAACAGCGCGGTGCTGCGGCTGATCG AGCTACCGTCTGAGCGTCTAAGCATAGGGCTGCCAGGCCGGGAAATAGCTG GGTCAATTCCACCTCCCTGTTGGCTATGTATATGGGGGAGACGTAACGCTCG CATAAAAAGGTGAAGTTGTTACCCTACGACTAACCATAGCGGGGAGCT CTCCCCCGCTCGCCCCCTGGCGTACGCTGCGATACTGCGAGGTTGGGTAC	Zellen
1/2_T3	TACCCCAAGCTTTGCTGATACCCAATGACCCTACACAATGGTGTATCAACCC AACATACCTGCATCAATGACCACTCCACCGCCAAGGCTCAAAAACACGCAG GGCACCACAGAGGTCGCGCAGGGGGTCTCCGGGTACCCCTCATGGGGGGT CACACAGTTACCCCAACCCAGACAGATTGACTCCTTCTCCTGACGACACCTA TGACGATGATACTTATCACCTAACGGTAGGAACAAATGGTGTATACATCTG GCCTCAGCTCCCGCGCTACCGAACCATCATACACCTGGGGGTGGCGACTCTC AGAAAAAAGTTTATGAAGGCTCCTGTACTCCCTCGGATATCACAGCTGCGT GACGGCCAA TTCTCGGCCG	Zellen
1/2_T7	TACAGGACGCCTCCATAAAGTTTTTCTGAGAGTCGCCACCCCCAGCTCTAT GATGGGTGCGTCTGGCGGGAGCTGAGGCACGATCTCTATTGAATTGTTCTTA CCGTTAGGGTGATTTGTATCATCGCCTTAGGTGTCGTCAGGAGAAGGATTCA AACAACTGGGTGTGGTGTATTTGCCTCCACAAAAGAAAATTTTACAACCT CTCTCCTTTGAACTAGTC	Zellen
3/1_T3	TACTACGGTAACCACAGCTCGAGTAGGGATGAAATTTTCATCCCACGGGT GGCTGGCCATGTAATCTAGGTAAAGGCTGCCTCGGTCCCTTTCCCTGGCGAC TAACTCACACCGTCGCTTGGTGCTTCTCTCTTGCCGGCCCATCCGCATCGAT AACGATGACCCCCCGAGTGCTGACACCGCTCCTACCTGCATTTTCACGGCC	Zellen

	CGTTGACCTACATTGATATACATCGTCTAATTCTGCGGATCACCTCGTACAG TCCAAGACAGCTGTGCGACCGTCTCACCTATGTGCTTAACGTGG	
3/2_T3	TAACAAGGACCCCTACAGCCGCGCTCTCAAACAACCCTGTCTAACCTCTTG GTCTTACCTGAGCTCCATCCCCATTTTCTAAACACCATAATAGTCTGCAC CCCCGACCTGACCCTACCGGTGTGCCCCCTGCGGTATGTCTACACCGGCCA TAAAGGTTCTCTGCTAACGGGCACAGTTAGTCTCACGGCCGCGGAGATT GATTCTGACCTCACGGTACTGCCTGTGATCCGCGAACTTAACGTCCAACACA CCTTCACAACTGCTGTACAGTGGTTGCCGGGTCAAAAACTACCGGACTGGC ATATCCTGGAATTACTCTGGAACATGAACACCACCCTTTACTCCCTGGGAT AGTCTCCT TGCCCAAGG	Zellen
1a_T7	TACAGGACGCCTCCATAAAGTTTTTCTGAGAGTCGCCACCCCCAGCTCTAT GATGGGTGCGTCTGGCGGGAGCTGAGGCACGATCTCTATTGAATTGTTCTTA CCGTTAGGGTGATTTGTATCATCGTCATAGGTGTCGTCTGGAGAAGGAGTCA AACGGTCTGGGTGTGGTGTGTGTGTGACCCCCCTGAGGGCTACCCCGACG ACCCCTTGCGCGACCTCTGTGGTGCCTGCGTGTGTTTGTAGCGTTGGCGGTG GTGTGGTCATTGATGGTGGTATGTTGGGTTGATACACCATTGTCTGGGGTCT GTTGGGTATCAACAAAGCTTGGGGTAC	Zellen
1b_T7	TACTTGTACCACATGTTATCTATGGCTGTTGTGGTTCATGGACCTGACAGAC GCCAAGGTGCTGAGAAACATAGACAAAGGGCCCGTTATCACACACGGCCCT CGCGAGTCTCGCCCTCCGGACGAACCTCGTGCGGCGCCACCTCAAGAGCGGT CCGGCAATTTCCGCGGGAACGGGTGTGGCTCTGACTCTGTGACGGCCACCG CCGACGCCTTGATCGTTTTGTGCTGAGAATGAGTGTTCCTGGACGTCCCACTC GTGGAAGAACAATACCCACGGTGTCACTGGTGTCTATCGTGGCCGCCGTGGA GCTGGTCACGCTCATCAACCACCATTTACAGTACTCCCTCGGATAACACAGT TGCCT	Zellen
2a_T7	TATTGGGATTTGACGCCAGACTTCTATCAACTAACAGCAGTCTGTGCAGCGA GTTAATATTTCCGCGCACTTAATGCAGATTTACCTACGCCCCAGCCTCGA GAGCAAGTCGATGTGTGCGAAGACCCATACAACGATCCGCCCCAACCTAGC TGCGCCAGTTTGTAGATGCAGTGCCGACTCCCTGGCTCTCGACAAAGCCT GTGTGATCGGACGGACAAACGAGTTGGTCCCTTTGGGAG	Zellen
2b_T7	TACGTAGCTGATGATGGCCCCGATGTCCAGCAGGTGACTATATTGGGGAGC GTGGGATAGCAGAAATTCACACTCGATATTCACCGCTCGGAGAACAGCTC ATAAATCCTTTTGGGCTCGGGCTTCTCAAATCCCCCAGGTAGTTGTTGCAG ATGCACCACGAGGCGCGAGTGTGGATCGCCTCGTCGCGGCTGATCAAATCA TTGCTCTGGAACGTTACCACAAATAGGTTGTGGGTA	Zellen
3_T7	GTACCTAACCTCGCAGTATCGCAGCGTGACGCCAGGGGGCGAGCGGGGA GATGCTGCCGCTATGGTTAGTCGTAGCGGTAACAACAACCTTCACCTTTTAT GCGAGCGTTACGTCTCCCCATATACATAGCCAACAGGGAGGTGGAATTGA CCCAGCTATTTCCCGGCTGGCAGCCCTATGCTTAGACGCTCAGACGGTAGC TCTCGATCAGCCGCGGCACCGCGCTGTTAACGTGTCTACCGGGCGCAATCAG ACCAACTTGACCAGGTTAATAGGCATAGAGCTGGAGAATAGACGCCGGACA GCCCCGTCCCAATAAACGAGGTGCTTGCCGCGCACGACGCCGTAGCCCTC CA	Zellen
5_T7	TAATTACAGTTGTTACAGTTGTGACAGACACAAAGCATTGCCAAACAGTTC CATCGACGTCGATGGACATCTGTGGGAGTTTTTGAGCCGACAATGTTTCGTA TTGGCATCTGAACCGCTTGGAATACCCATAGTGGTACGCTCCGCCGATCTCT ACAGATTTTCATCGAGTTTATTGACCCTACCAAAGGCGTGTAGGCCAATAGT CAGAACCAGGGGGGATACAGCTATAGCTCTAGATAGAAACGGGGTGGTTTA CCACGAAGATAGAATGGGTGTGAGCATAGAGTGGCTCTCTGTACTCTCTGG CTATAACCATCTCAACTCCAGCCTTATCATT	Zellen
6_T7	TAACTTTTCTCGATCCATACTCTATTTCCATGATCGGGCTCTCAAACAAG CAGCCGTTACGCGTGATGATGTTTTTATGTGTTCTGACCCGACCCGCGGT GCCAGGTTGGGTTTTCCCTGCTGCCTTTTCATCGACCCCAATGGGGGCTGG AGAAAAGCGACGCGCGTTTTAGGAGGAAGAAAGCGACCACCCCCCAAAA AACTATTTCTGACGGGAAGCTGTTTA	Zellen
7_T7	TAAACTCCTCCAGGTACTTGACGGCTTTGGCTATTAGGGCGTCGCTCGGAAT GTAAAGCTTTACCCGTCGGCCAAACCTTTTCAGCGACTTCTGCGTTCCGA ACGTACGTGACCTCTTCTAGGGCCTGCTTATTTCCCGGAGCGACACCCCA CTGCTTGAAGCACGTCTGCCCCGAGCTTGCTCAACACGTCCATCTCGGCGTT GAATTCGTTGTAACACTTGCCGTAGAAATCTACGTACTTGGCTAGCTGC	Zellen
1_1_T7	TACAAGCTTTTTGAGGTGCGGTCCACGCGGCCGAGGCTGCGCGGTCTCTGC GCGACGCGGTGATGCGAGGCGAAAACCTCCTAGAGGCGCTCGCGTCGGCGG ATGAAACCCTATCTTGGTGCAAGATGATCGTCACCAAAAACCTACCAATGC GCACCAGAGACCCTATCATCTCTTCTCGGTGGCCCTGCTGGACAACCTGCG CCTGAAACTTGAGCCCTTTATGCGGTGCTACCTCTCATCGTCGGGAAGCCCT ACCTCGCAGAGCTGTGCGACCAACAGCGGCTGTCTGACGTGCGGTGTGTTT CCACCTTCATGTTCTGTGATGTTGGCGCGCATAGCTCGGGCTGTAGGGAGCGG CGCCGAAACTGTGTCCAGGGACGCACTGGGACCCGACGGGCGCGTTCTAGC	Leber

	CGACTACGTACTCCCTCGG ATAGCACAGTTGCCT	
1_2_T7	TACATAGACTGGATAGCCTGTCTGGGTCTGATTCCGCTCCAGCGGCTCAAGC GCGCCCCCGGCGCGACCGTCCACCCTAAGCTGTGGCGGAAGCTGCCCCACGG ACGTTCCCTCGCTGGAGAGCTGCGTGACGAGCGTGACCTGGCCGGTAAAC TGTATGTGGCCAACAGCCTCCTGCGAGAGGGGTTGGAGGCCGTGGTGGAGC TGGCCAGGTGCACCGCCAGCGTGGCCATCATGGACTACGACAGGGTGAATA TATTCTACCACTACACCCGCAGAGAGGTGGTGGCGATAGACTCGACCACGG GCAAGCGGGGAGAGTGTCTGGTGTGTGGCAGCCAATATGGAAGGACGGCA GCGTGCTGTTCTGACTACCGCTACAGCGAATCTGTGGCGAGGTGTGTAAGT CCACGCCCTGCGGGAACACGCAAACTGTGCCAGCTTCTCAACACGGTACT CCCTCGGATAGCACAGTTGCCT	Leber
2_1_T7	TACGTCCGTCCGACGATCGCGTGTAATACTTTCTTGGTTTTTCGCGCTTGAATT ACAGACTGGAGCTGGTCTCTAATCTGCTTGGCGTGAGCTCTGCGACACAGG ACGAACATCTGCAGGCTTTTATTGCTTCGCATGACCCGCTCCGAGGAGGGG AGTGACGCTTCTGCGGCGCGTCGAGCTTGCCTGGAGAACGAGGAGGTTT TGGTGCACGCAATGGTGAATTTAGCCAGCGTCACGCGCAGGTCTTTTCTAAT GGTGTCCGTGAGCTGACGGCGGCCGAGTTCGTCAATGGAGGATACCATAAA CATGGTGTCAAAGCCGACATAGTTGGCGTTCTCTCCATCCGGGGCGAGACCC TTGATGGATTCCACGGAAGGTCGGGT	Leber
2_2_T7	TACCCGACCTTTCCGTGGAATCCATCAAGGGTCTCGCCCCGGATGGAGAGA ACGCCAACTATGTCGGCTTTGACACCATGTTTATGGCATCCTCCATTGACGA ACTCGGCCCGCGTCAGCTGACGGACACCATTAGAAAAGACCTGCGCGTGAC GCTGGCTAAATTCACCATTTGCGTGACCAAAAACCTCCTCGTTCTCCAGCGCA AGCTCGACGCGCCGAGGAAGCGTCACTGCCCCCTCCTCGGAGCGGGTCATG CGAAGCAATAAAAGCCTGCAGATGTTTCGTCTGTGTCGAGAGCTCACGCC AAGCAGATTAGAGACCAGCTCCAGTCTGTAATTCAGCGCGAAAACCAAGA AAGTATTACACGCGATCGTCGGACGGACGT	Leber
3_1_T7	TACTGGCCTTGCCCGTGTGGTGGAGGACACGAAGATGATCTTGCAGTTGGT CTGGTTACAGAAAGCCTATAATCGTTTGACCCGCTTCGGGGCGTATAAAGTTT GCCTCGTCCACAAATAGCAGGTTAAAGTCTTGGCCGCGAATCCCCTGAAAC ATAGAGAGAATAAAAAAAGGGATCGACGGGTTAGGCGTTTCACTTAAGCTC GGCTCTCGACGCGGGCCGAGCAATTTCTGTAAACCGGCTACCCTGTTCC ATACCTCCCGGCGCACCAACGGCGCAACAATAATCCGTCTGACACTACTAT GGACGCGCACATCGCTAACGAAACCAAGCATCTACTGGTACTCCCTCGGAT AGCACAGTTGCCT	Leber
3_2_T7	TACCAGGTGCCGAATACCACCCCGTTTGAGCCGCCGCGGCGCGGCTCACA AACACCGTGGCTAATAAGTCTACGGCCAGGTTCTGTGTCGAATCCATGGGA ACGTCGTTCTTAGCGATTTGAATTTCACTGAGCGATTGTCCGATGTTGTGCG GGCGCTGATCCGTTCACTCGCGTTTACCTGGGGCGTGGCGGCGTCGGCGCT CTCCGCTGCACGCGCGCATCTTCGAGGGCCGCCAGGGCATCAGCTACTTTG GCAACCTGTGCTCTAGGGGTCTAATCAACGCATCTACGTTTGCAACTCCGT ACTC	Leber

### 3.2. Sequenzen der *random*-PCR-Methode

**Tab. 44: Sequenzen der EHV-1-haltige Klone aus der *random*-PCR-Methode**

Klon	Sequenz	Quelle
1_T7	GATGCTCATGAAGGGGGTCGACCTGGTCCGCAAAAATAAAGTCTTTTCATA AACTTGTACGCGCGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTACGACGAGGATGTGG CCACGGCGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAATGGGTGGGGC GCCCCGTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGAGTGCTGGTAGAGGCGT ACAACCGTATCACTGCCCCCAACTTGACGTGCGCGAGTTCTGTTATGACTGC TGAGCTGAGCCGCTACCCGAATCGTATACCAACAAGCGCCTGCCGACCT CACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGCCAGCGTAAA AGAGAGAATTCCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCGAGGCCGCGGAACGCGA AGCGGGTGTAGTAACTCAATGCGCGGTACCGCCCAAAACCCCGTGGTAAC CAAGACCGCACGCCCCAACCTAAACGCAAACTGCTGGTTTCCGACCTCGC CGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTA CTATTCTCCACCTGTTGGGTACCATAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTTCG GAAATGATGTGAGAACAAACAGAAAATCTTTTAAAGCGGTTTATTCCGAAA CCCCCACAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGCT TTGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGAAGAAAGTCGTGCAATACTGC ATACAGTTTTTTGTAAGTCTAGAAAGCAGCTCCCCATCAAAGCTGAGATCGCAC ATTTTACAATAAATGTCTCCAGCACTAACCGTTGGTATATCCATGTCTGTTT TT	ZKÜ
4_T7	GATGCTCATGAAGGGGGTCGACCTGGTCCGCAAAAATAAAGTCTTTTCATA AACTTGTACGCGCGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTACGACGAGGATGTGG	ZKÜ

	CCACGGCGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAAATGGGTGGGGC GCCCCGTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGAGTGCTGGTAGAGGCGT ACAACCGTATCACTGCCCCAACTTGGACGTGCGCGAGTTCGTTATGACTGC TGAGCTGAGCCGCTCACCCGAATCGTATACCAACAAGCGCCTGCCGCACCT CACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGCCCAGCGTAAA AGAGAGAATTCCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCGAGGCCGCGGAACGCGA AGCGGGTGTAGTAACTCAATGCGCGGTACCGCCCCAAAACCCCGTGGTAAC CAAGACCGCACGCCCCAACCTAGACGCAAACCTGCTGGTTTCCGACCTCGC CGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTA CTATTTCTCCACCTGTTGGGTACCATAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTTCG GAAATGATGTGAGAACAACAGAAAATCTTTTAAAGCGGTTTATTCCGAAA CCCCCACAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGGCT TTGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGAAGAAAGTCGTCGAATACTGC ATACAGTTTTTTGTACTCTAGAAGCAGCTCCCCATCAAAGCTGAGATCGCAC ATTTTACAATAAATGTCTCCAGCACTAACCGTTGGTATATCCATGTCTGTTG TT	
1-1_T7	ATGCTCATGAAGGGGGTCGACCTGGTCCGCAAAAATAACTGCTCTTTCATAA ACTTGTACGCGCGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTACGACGAGGATGTGGC CACGGCGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAATGGGTGGGGC GCCCCGTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGAGTGCTGGTAGAGGCGT ACAACCGTATCACTGCCCCAACTTGGACGTGCGCGAGTTCGTTATGACTGC TGAGCTGAGCCGCTCACCCGAATCGTATACCAACAAGCGCCTGCCGCACCT CACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGCCCAGCGTAAA AGAGAGAATTCCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCGAGGCCGCGGAACGCGA AGCGGGTGTAGTAACTCAATGCGCGGTACCGCCCCAAAACCCCGTGGTAAC CAAGACCGCACGCCCCAACCTAAACGCAAACCTGCTGGTTTCCGACCTCGC CGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTA CTATTTCTCCACCTGTTGGGTACCATAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTTCG GAAATGATGTGAGAACAACAGAAAATCTTTTAAAGCGGTTTATTCCGAAA CCCCCACAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGGCT TTGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGAAGAAAGTCGTCGAATACTGC ATACAGTTTTTTGTACTCTAGAAGCAGCTCCCCATCAAAGCTGAGATCGCAC ATTTTACAATAAATGTCTCCAGCACTAACCGTTGGTATATCCATGTCTGTTG	Zellen
1-2_T7	ATGCTCATGAAGGGGGTCGACCTGGTCCGCAAAAATAACTGCTCTTTCATAA ACTTGTACGCGCGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTACGACGAGGATGTGGC CACGGCGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAATGGGTGGGGC GCCCCGTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGAGTGCTGGTAGAGGCGT ACAACCGTATCACTGCCCCAACTTGGACGTGCGCGAGTTCGTTATGACTGC TGAGCTGAGCCGCTCACCCGAATCGTATACCAACAAGCGCCTGCCGCACCT CACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGCCCAGCGTAAA AGAGAGAATTCCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCGAGGCCGCGGAACGCGA AGCGGGTGTAGTAACTCAATGCGCGGTACCGCCCCAAAACCCCGTGGTAAC CAAGACCGCACGCCCCAACCTAAACGCAAACCTGCTGGTTTCCGACCTCGC CGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTA CTATTTCTCCACCTGTTGGGTACCATAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTTCG GAAATGATGTGAGAACAACAGAAAATCTTTTAAAGCGGTTTATTCCGAAA CCCCCACAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGGCT TTGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGAAGAAAGTCGTCGAATACTGC ATACAGTTTTTTGTACTCTAGAAGCAGCTCCCCATCAAAGCTGAGATCGCAC ATTTTACAATAAATGTCTCCAGCACTAACCGTTGGTATATCCATGTCTGTTG	Zellen
1/3_T7	TGGTAGCAGAGCGAGTGCGAACGACGCTGAAATCTTAACCTCGGGGGCGC TATTAAGCTCCGGGGCGCTCTCTGCCCATGCGACGGCCGTGGCTAAGCTACT CTCGTCCAACGAACCCGACGACGTGTCGTCCCGGGCCAGGGCGCGCTGGC CGAGCACGCCAGTAACACCTGGGAGACCATCCAGGCCAGCACAAACCCAC ACAAGTCGTGGAAGCCCTAGTGACTGCGGGGTTTACGTCCACACACTGTGG AATTTTGGAGCGCGTGGTGGTGGACTATTTTACGCGCCTGCGAAGCACCGCC AACAGCGGGCCGGGAGAAACGACTCCCTAGACTACGCGCAACAAGTCGTT GGTTGCGTGGCTATAGTAGCGCGGCTTGTTTTACAGGTGCTGTGTCTACG GCTTTGGGCTAGACTACATCCGGGACTACACGACAACGATATCCACGCTGG AGCCCGTGTACAACGAGCTGCTGTCTGCCCTGGGTCTGGCGGACAAGGGAG TGGAACAGACCCTGAAGCGCAGCATGGCACCGCGCCCGTATATGAACTACA TCTCAGCGGCACGCGCCGCGCTAGACGACGAGCTGTTAATAGTCGAAAAGC GCACCACTGGGCCCCGAACCCATAGCGCCGCGAGGGAGTCCCTACTGACGT GGTTCGACTTTAGGGCCCGAGATCGATGGGGTGTGCGTATACCAGATAGAG ATACACATCGACACAGGTTTTTGGCCCCAATCACAGCATCGCTTTATTCCGA CGACGACCTAATAGCGGCGGCATCTAAACTGTCGTTTGATGCACTAGACGC ACCCCTACCCAAATTATAGACGACCCCTCTT	Leber



#### 4. Karte von Vektor pCR®4-TOPO

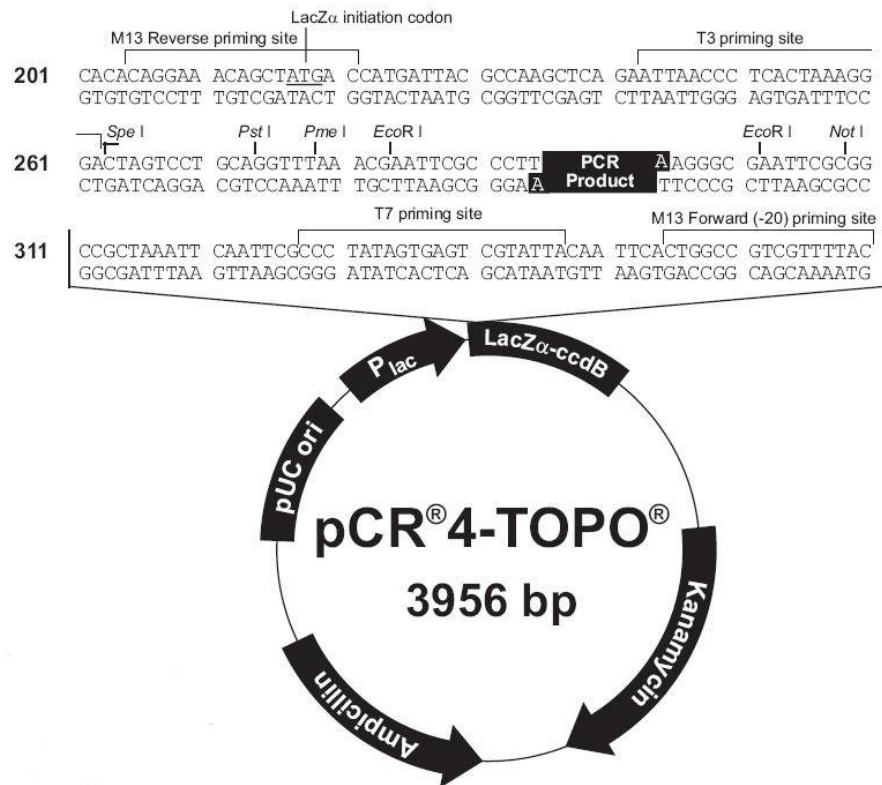


Abb. 26: pCR®4-TOPO-Karte zur Darstellung der T3- und T7-priming sites

Quelle: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcr4topo\\_map.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf)  
 Die priming sites des T3- und T7-Primers liegen auf den komplementären Plasmidsträngen.

## DANKSAGUNG

Herzlichen Dank an Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek für die freundliche Aufnahme am Institut für Tierpathologie, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Vertretung der Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Mein Dank gilt ebenso Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter für die freundliche Aufnahme am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen und die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Robert Fux für die fachliche Betreuung, freundschaftliche Unterstützung und für die vielen hilfreichen Ratschläge und Inspirationen, die die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Jessica Molin für die praktische Unterstützung und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Bei Andrea Jahnke, Christine Poneleit und Mareike Pollaerts möchte ich mich herzlich für das angenehme Arbeitsklima, die vielen anregenden und unterhaltsamen Gespräche und vor allem für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken bedanken.

Auch bedanke ich mich herzlich bei meinen Doktoranden-Kollegen aus der Virologie Martina Kaserer, Marcus Müller, Phil Price, Martina Resch, Fei Song und Lino Torres für die vielen Ratschläge und die angenehme und heitere Zeit im Büro. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden aus der Neuropathologie Judith Berkmüller, Simon Bertram, Ulrike Foitzik, Simone Gross, Eva Wagner und Sonja Wünsche für die nette und freundschaftliche Atmosphäre.

Auch allen anderen Kollegen in beiden Instituten gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Die Studie wurde durch den Nachlass Dr. Karl Heinz Kurtze unterstützt.